

Inês Fernandes Lampreia

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Implementação de Método em HPLC
para a Determinação de PAH's em Óleos Vegetais**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Ana Raquel Correia Gonçalves Marques, Responsável de Qualidade,
Empresa: Sovena Oilseeds Portugal S.A.

Co-orientador: Pedro Calado Simões, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Ana Maria Martelo Ramos, Professora Associada da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, Professor Auxiliar com
Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Março 2014

Implementação de Método em HPLC para a Determinação de PAH's em Óleos Vegetais

Direitos de Cópia

O autor concede à Faculdade de Ciências e Tecnologia e à Universidade Nova de Lisboa, nos termos dos regulamentos aplicáveis, o direito de divulgar e distribuir copias desta dissertação. Concretamente:

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem geográficos de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas que intervieram na sua elaboração e no percurso que decorreu da sua execução.

Assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de uma forma directa ou indirecta tornaram possível a concretização deste projecto.

Ao Professor Pedro Simões, pelo contacto que tornou possível a realização deste estágio e pelo acompanhamento e disponibilidade quando necessário durante todo o estágio.

À Eng.^a Lina Dionísio, Directora Fabril, pela possibilidade de realização do estágio.

À Eng.^a Ana Marques, responsável do Departamento de Qualidade, pela sua disponibilidade, orientação e apoio no decorrer do estágio.

À Eng.^a Marina Reis, responsável da Refinaria, pela sua disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, durante o estágio.

Aos professores do departamento de química Orgânica João Paulo Noronha, João Sottomayor entre outros pelos seus úteis esclarecimentos no início deste trabalho.

Aos operadores da refinaria e analistas do laboratório de Biodiesel, Maria João Leandro, Sofia Almeida, Rúben Moreira e Tânia Pascoalinho pelo apoio, colaboração, ajuda e conselhos imprescindíveis.

Ao meu namorado, pelo seu apoio, paciência, compreensão, ajuda, ideias novas e incentivo sempre que necessário, pela amizade e pelo amor demonstrado e por me ter suportado durante os meses de realização deste trabalho desde o início e nos momentos mais difíceis.

À minha família, pais e mano, pela motivação, paciência, por estarem presentes nos bons e nos maus momentos e por todo o apoio oferecido na realização de todo o trabalho e ao longo de toda a minha vida académica como também ao longo da minha vida porque sem vocês nem metade seria possível.

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante.

(Antoine de Saint-Exupéry)

Resumo

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's), doravante designados PAH's são considerados poluentes prioritários, devido às suas características tóxicas, cancerígenas e mutagénicas. No entanto, apenas 16 destes compostos são referidos na lista de compostos orgânicos prioritários, na qual estão inseridos os 4 PAH's estudados neste trabalho - Benzo[a]antraceno, Benzo[a]Pireno, Benzo[b]fluoranteno e o criseno.

A origem dos PAH's no ambiente provém de fontes naturais e antropogénicas. Vários processos têm sido desenvolvidos para remover e/ou reduzir estes contaminantes no ambiente. A sua maioria passa por reduzir a poluição causada por fontes antropogénicas. No entanto, devido à dificuldade de remover totalmente estes contaminantes é necessário controlar a concentração destes compostos durante o processo de fabrico de alimentos.

Os PAH's podem ser encontrados em diferentes géneros alimentícios tais como óleos vegetais. Sendo a Sovena produtora destes surge como objectivo deste trabalho implementar e validar um método analítico para a quantificação dos 4 PAH's nos óleos crus e refinados de forma a garantir que o contaminante é eliminado ou reduzido até níveis aceitáveis. Esta quantificação foi feita em HPLC com detector de fluorescência (FLD), utilizando-se o método da adição de padrão interno, neste caso o Benzo[b]Criseno.

Para avaliar a linearidade do método procedeu-se à representação gráfica da função Área=f (concentração), obtendo – se uma função linear na gama de 1 a 50µg/kg. A média da precisão medida através do coeficiente de variação variou entre 1,63 e 7,49%, a exactidão obtida pela média da percentagem de recuperação variou entre 65,0 e 107,5% sem matriz e entre 59,2 e 87,8% com matriz (óleo alimentar). O limite de detecção obtido foi de 0,5 µg/kg e o limite de quantificação 1 µg/kg. Através da comparação de resultados com laboratórios externos foi possível um constante desenvolvimento no sentido de melhorar os resultados.

Palavras-Chave: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, *HPLC*, óleos vegetais, SPE

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, hereafter PAH's are considered priority pollutants due to their toxic, carcinogenic and mutagenic characteristics. However , only 16 of these compounds are listed in the list of priority organic compounds , in which are inserted the 4 PAH's studied in this work - Benzo[a]anthracene , Benzo [a]pyrene , benzo[b]fluoranthene and chrysene .

The origin of PAH's in the environment comes from natural and anthropogenic sources. Various processes have been developed to remove and/or reduce these contaminants. The majority is to reduce pollution caused by anthropogenic sources. However, due to the difficulty in fully removing these contaminants is necessary to control the concentration of these compounds during the process of manufacturing food.

PAH 's can be found in different foods such as vegetable oils. As Sovena producing vegetable oils appears aim of this work implement and validate an analytical method for the quantification of 4 PAH's in crude oils and refined oils to ensure that the contaminant is eliminated or reduced to acceptable levels. This quantification was done on HPLC with fluorescence detection (FLD), we used the method of addition of internal standard, in this case the Benzo[b]Chrysene.

To evaluate the linearity proceeded to the graphical representation of the function $\text{Area} = f(\text{concentration})$, whereby - a linear function in the range of 1 to 50 $\mu\text{g/kg}$. The average precision measured by the coefficient of variation varied between 1,63 and 7.49 % , the accuracy obtained by the average percent recovery ranged from 65,0 and 107.5% without matrix and between 59,2 and 87,8% (cooking oil) matrix. The limit of quantification was 1 mg/kg. Through the comparison of results from external laboratories was possible constant development to improve the results.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, HPLC, vegetables oils, analytical method, SPE

Índice de Matérias

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
1. Empresa Sovena Oilseeds	1
1.1. Breve história da empresa	1
1.1.1. Organização.....	3
2. Introdução.....	5
2.1. Introdução aos PAH's	8
2.1.1. Estrutura química e nomenclatura	11
2.1.2. Características físico-químicas	12
2.1.3. Formação.....	15
2.2. Degradação de PAH's	19
2.3. A alimentação como fonte de exposição a PAH's	23
2.4. Presença de PAH's nos óleos vegetais	26
2.5. Métodos analíticos de determinação de PAH's.....	30
2.5.1. Preparação da amostra.....	30
2.5.2. Extracção e purificação	31
2.5.2.1. Extracção por solventes	31
2.5.2.2. Extracção em fase sólida	34
2.5.3. Separação cromatográfica	38
2.5.4. Detecção cromatográfica	40
3. Descrição do processo experimental	45
3.1. Objectivos	45
3.2. Amostras.....	46
3.3. Método Experimental	47
3.3.1. Materiais e equipamento.....	47
3.3.2. Solventes e Reagentes	50
3.3.3. Preparação de Soluções	51

3.3.3.1. Preparação de soluções de reagentes	51
3.3.3.2. Preparação de soluções-padrão	51
3.3.4. Equipamento e condições de análise	53
3.3.4.1. Optimização das condições operacionais	55
3.3.5. Procedimento Experimental	57
4. Resultados e discussão.....	58
4.1 Sumário do desenvolvimento do método	58
4.2 Especificidade/Selectividade	58
4.3 Calibração analítica	59
4.4 Intervalo de Linearidade Analítica	62
4.5 Gama de trabalho.....	70
4.6 Cálculo dos limites de detecção e quantificação	62
4.7 Precisão... ..	66
4.7.1. Precisão do Equipamento	66
4.7.2. Precisão do Método	67
4.8 Exactidão/Veracidade.....	67
4.9 Estabilidade das soluções	70
5. Conclusão	70
5.1 Vantagens e desvantagens do método e trabalhos futuros	70
5.2 Comparação do teor de PAH's em óleos vegetais com laboratórios externos.....	71
6. Evolução dos teores de PAH's ao longo do processo de refinação dos óleos vegetais	75
7. Bibliografia	77
8. Anexos	80

Índice de Figuras

Figura 1 – Instalações fabris da Sovena Oilseeds Portugal	1
Figura 2 - Empresas da Sovena Group	3
Figura 3 - Representação da estrutura molecular dos 16 PAH's considerados poluentes prioritários pela EPA adaptado de [8]	9
Figura 4 – Representação esquemática do movimento global dos PAH's no meio ambiente [15]	17
Figura 5 – Exposição aos PAH's	23
Figura 6 – Eliminação dos PAH's no processo de extracção e refinação. * PAH's eliminados ou reduzidos a níveis aceitáveis	28
Figura 7 - Colunas de extracção em fase sólida (a) e sistema de filtração sob vácuo (b) [28]	36
Figura 8 - Etapas do processo de extracção em fase sólida (Adaptado da Ref ^a [27])	37
Figura 9 – Equipamento HPLC	48
Figura 10 - Coluna Cromatográfica fase reversa C18	48
Figura 11 - Balança analítica	49
Figura 12 – Cartucho SupelMIP TM SPE-PAH's (referência 52773-U) 50 mg	49
Figura 13 – Corrente de Azoto Air Liquide	49
Figura 14 - Cromatograma de uma solução padrão dos 5 PAH's analisados (100 µg/kg)	59

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Teores máximos de PAH's aplicados a géneros alimentícios, retirado da ref. ^a [2]	7
Tabela 2 – Prováveis PAH's carcinogêneos humanos e potência relativa estimada	10
Tabela 3 – Tipo de fusão dos PAH's	11
Tabela 4 - Principais propriedades físico-químicas dos 4 PAHs estudados, adaptado ref ^a [13]	14
Tabela 5 – Processos de degradação de PAH's em diferentes matrizes	18
Tabela 7 - Características gerais de AgriTecSorbents AgriCarb DC 600 [21]	21
Tabela 8 - Características gerais de Chemviron Carbon [21]	21

Tabela 9 - Características gerais de Norit SA 4 PAH-HF [21]	22
Tabela 10 – Características dos procedimentos tradicionais na extração por solventes de PAH's de óleos vegetais	33
Tabela 11 – Cálculos realizados na preparação das soluções padrão Dr. Ehrenstorfer para as rectas de calibração	52
Tabela 12 - Cálculos realizados na preparação da solução padrão da Fluka para a recta de calibração	53
Tabela 13 – Condições operacionais do método analítico	54
Tabela 14 – Gradiente e fluxo usado no método analítico	54
Tabela 15 - Gradiente e fluxo usado no “método lavagem”	54
Tabela 16 – Tempos de retenção dos PAH's em estudo	60
Tabela 17 – Limites de detecção ($\mu\text{g/kg}$) obtidos através do método da amplitude máxima de ruído.....	64
Tabela 18 - Limites de detecção ($\mu\text{g/mL}$) obtidos através do método da amplitude média do ruído.....	65
Tabela 19 - Limites de quantificação ($\mu\text{g/kg}$)	65
Tabela 20 – Análise de repetibilidade e percentagem de recuperação do analito com concentração próxima do limite de quantificação	66
Tabela 21 – Análise de Repetibilidade do método analítico	67
Tabela 22 – Análise de recuperações no método analítico sem matriz	68
Tabela 23 – Análise de recuperações no método analítico com matriz.....	69
Tabela 24 – Resultados dos teores de PAH's antes e depois do processo de refinação	76
Tabela 25 – Resultados comparativos do teor de PAH's em óleos vegetais com laboratório externo.....	80

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Emissões industriais de PAH's para o Ar [14]	16
Gráfico 2 - Emissões industriais de PAH's para a água [14]	16
Gráfico 3 – Ingestão média diária de PAH's [22]	24
Gráfico 4 - Níveis de PAH's totais em grupos alimentares, Catalunha, Espanha [25]	25
Gráfico 5 - Recta de calibração Benzo[a]Antraceno	60
Gráfico 6 - Recta de calibração de Criseno	61
Gráfico 7 - Recta de calibração de Benzo[b]Fluoranteno	61
Gráfico 8 - Recta de calibração de Benzo[a]Pireno	61
Gráfico 9 - Recta de calibração de Benzo[b]Criseno	62
Gráfico 10 – Desvios obtidos no composto Benzo[a]Pireno na comparação com resultados externos	72
Gráfico 11 - Desvios obtidos no composto Benzo[a]Antraceno na comparação com resultados externos	72
Gráfico 12 - Desvios obtidos no composto Criseno na comparação com resultados externos	73
Gráfico 13 - Desvios obtidos no composto Benzo[b]fluranteno na comparação com resultados externos	74

Símbolos e Abreviaturas

AESA	Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos	FLD	Detector de Lâmpada Fluorescente
B[a]A	Benzo[a]antraceno	HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (designação Anglo-saxónica)
B[a]P	Benzo[a]Pireno	PAH's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (designação Anglo-saxónica)
B[b]C	Benzo[b]criseno		
B[b]F	Benzo[b]fluoranteno		
CCAH	Comité Científico de Alimentação Humana	REEP	Registo Europeu de Emissão de Poluentes
Cri	Criseno	SPE	Extracção em fase sólida (designação Anglo-saxónica)
EU saxónica)	União Europeia (designação Anglo-	SOP	Sovena Oilseeds Portugal
		US – EPA	Agência de protecção ambiental (designação Anglo-saxónica)

1. Empresa Sovena Oilseeds

1.1. Breve história da empresa

As instalações industriais da empresa situam-se no município de Almada, na zona ribeirinha da margem sul do rio Tejo, a cerca de 3 km da entrada sul da ponte 25 de Abril, ocupando uma área de aproximadamente 195.000 m² de terreno. A zona do cais, onde são realizadas as cargas e descargas de óleo e sementes, é concessionada pela Administração do Porto de Lisboa (APL).



Figura 1 – Instalações fabris da Sovena Oilseeds Portugal

A empresa Sovena Oilseeds Portugal S.A., doravante designada por SOP, foi fundada no ano de 1973 pelas Fábricas Mendes Godinho S.A., com a designação de Tagol – Companhias de Oleaginosas do Tejo S.A., com o intuito de desenvolver um negócio na área do fornecimento de matérias-primas à indústria de alimentos compostos para animais.

As actividades na primeira fábrica de extracção iniciaram-se durante o ano de 1975, com uma capacidade instalada de 400 toneladas de soja por dia. O descarregamento das sementes era feito em batelões no meio do rio e daí transportado para o cais. Tal aconteceu até ao ano de 1979, altura em que se conclui a construção de um silo portuário de 35.000 toneladas e de um ponto provisório de acostagem de navios, tornando-se, a partir de então, possível o descarregamento directo do navio para as instalações fabris.

Mais tarde, em 1981, entrou em funcionamento uma segunda fábrica de extracção, com uma capacidade instalada de 1500 toneladas de sementes de soja por dia. Em 1989, após várias remodelações, iniciou-se a laboração de uma refinaria de óleos vegetais com uma capacidade de 150 toneladas de óleo por dia.

No ano de 1999 a antiga Tagol foi adquirida pelo grupo ALCO, o qual, em 2008 se passou a designar por Sovena Group.

A partir do ano de 2000, a extractora mais antiga foi reconvertida passando a dedicar-se à extracção de óleo de girassol, com uma capacidade de processamento de 800 toneladas por dia de semente.

Em 2005, a capacidade de refinação foi também aumentada de 150 para 220 ton/dia e em 2006 a segunda fábrica de extracção, com aquisição de um novo DTDC, passou a laborar 1800 ton/dia.

Em 2012 a fábrica de extracção por solvente de óleo de Girassol/Colza foi renovada e, em Março, arrancou a nova extracção de Girassol/Colza.

A Sovena Oilseeds Portugal é hoje um operador Ibérico de excelência tanto a nível da prestação de serviços portuários, como no desenvolvimento do mercado transformador no sector de processamento de sementes oleaginosas.

Actualmente a Sovena dispõe de duas instalações de extracção, anteriormente referidas, com uma capacidade nominal total de 2750 toneladas de girassol, colza e soja por dia, dispõe ainda de uma refinaria de óleos vegetais com capacidade de processamento diária de 230 toneladas de óleo cru. Além disso, existe ainda uma instalação de fabrico de soja integral (*full fat*), cuja capacidade é de 240 toneladas por dia. Todos os produtos obtidos nestes processos destinam-se ao sector alimentar, quer à alimentação humana, no caso dos óleos vegetais, quer à alimentação animal no caso das farinhas de girassol, colza, soja e *full fat*.

A Sovena possui ainda uma fábrica de produção de biodiesel com uma capacidade de produção de 300 toneladas diárias. Esta é composta por duas unidades produtivas: unidade de pré-tratamento (refinação física - onde o óleo cru é preparado para a etapa seguinte) e unidade de fabrico de biodiesel.

Um dos pontos fortes da Sovena é o terminal portuário existente, que permite efectuar descargas de navios e expedir matérias, não apenas por via rodoviária, como também por via marítima. O conjunto dos três pátios existentes tem uma capacidade de 2000 toneladas de matérias-primas por hora, permitindo a recepção de navios até 80000 toneladas. As importações das matérias-primas são essencialmente da América do Norte e Brasil no caso da soja, e de Espanha, França, Argentina e países de leste, como Ucrânia, Roménia e Bulgária no caso do girassol e colza.

Para efeitos de prestação de serviços (descarga, armazenamento e expedição), o estabelecimento dispõe de silos, com uma capacidade de armazenagem de aproximadamente 100000 toneladas, onde se encontram produtos como milho e seus derivados, trigo, cevada, entre outros, destinados maioritariamente a fábricas de rações para animais [1,2].

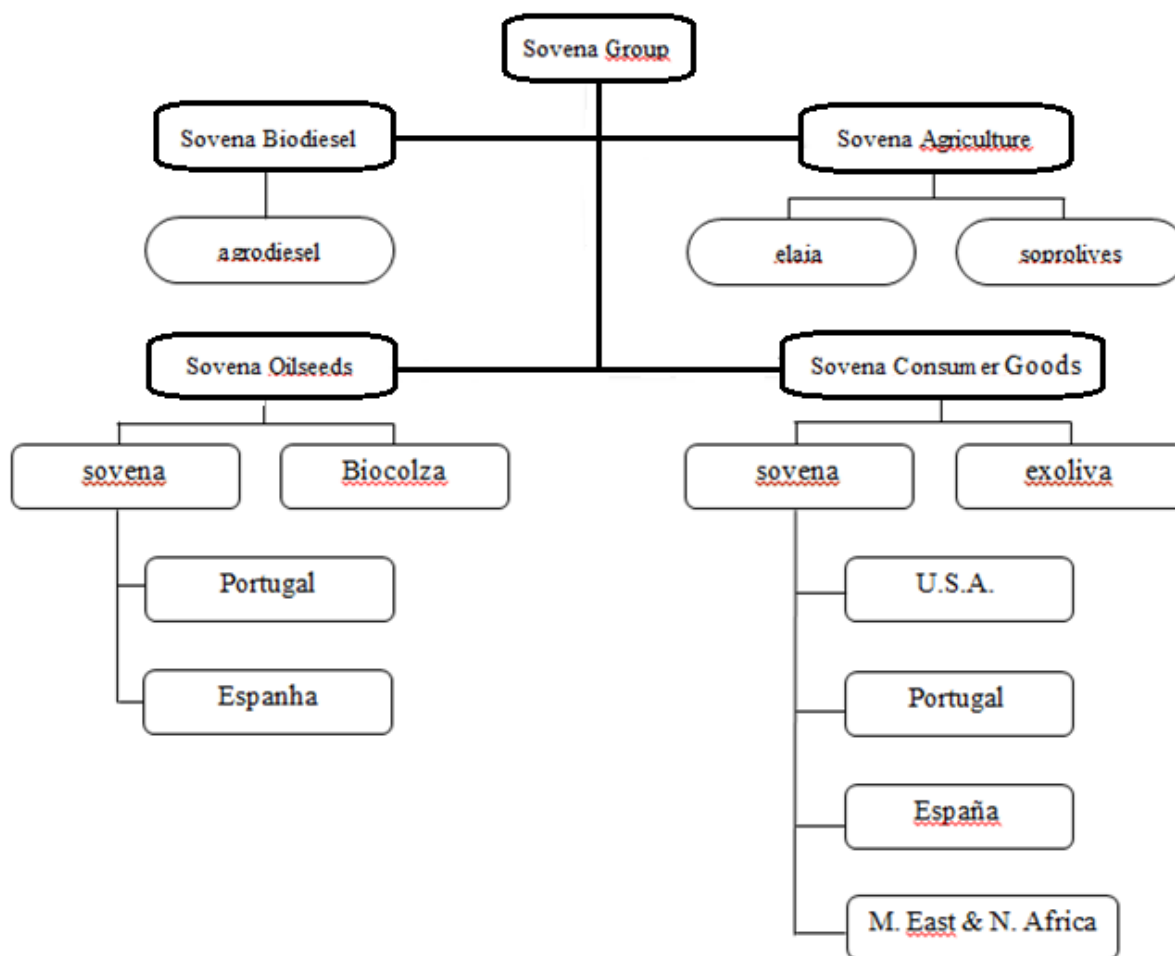


Figura 2 - Empresas da Sovena Group

1.1.1. Organização

A Sovena Oilseeds Portugal S.A. (SOP) está inserida no Sovena Group, que opera ao nível do mercado mundial. O Sovena Group tem 4 áreas de negócio interrelacionadas e que cobrem todo o espectro da cadeia de valor dos azeites, azeitonas, óleos e mesmo dos sabões. As empresas incluídas no grupo actualmente são:

- **Sovena Consumer Goods** – Com operações fabris em Portugal, Espanha, EUA e Tunísia e presença comercial no Brasil e Angola, esta área loteia, embala e comercializa os produtos Sovena em cada mercado.
- **Sovena Oilseeds** – Os óleos vegetais são a génese do grupo, actua em Portugal e Espanha, no fornecimento de sementes para a plantação de oleaginosas e comprar sementes no final da colheita para produção e refinação dos óleos.
- **Sovena Agriculture** – Exploração de olivais próprios ou arrendados, além da gestão de lagares. Um projecto único a nível mundial, a operar em Portugal, Espanha e Marrocos e em plena expansão para outras regiões do mundo.

- **Sovena Biodiesel** – a utilização de oleaginosas para a produção de bio combustíveis abriu as portas do mundo da energia ao Grupo Sovena[1,2].

2. Introdução

No âmbito do plano de protecção da saúde pública e considerando essencial, para o interesse deste, manter os contaminantes, a níveis toxicologicamente aceitáveis, existiu a necessidade de privilegiar a procura de uma solução global para o problema dos contaminantes na alimentação. Considerando que os PAH's, fazem parte deste grupo de contaminantes surgiu a necessidade da realização deste trabalho.

A 8 de Fevereiro de 1993, o Comité Científico da Alimentação Humana (CCAH) adoptou o Regulamento (CEE) nº 315/93, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Tendo por base este regulamento, a Comissão das Comunidades Europeias adoptou, mais recentemente, em Dezembro de 2006, o Regulamento (CE) nº 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no qual estavam estabelecidos teores máximos para o benzo[a]pireno. Segundo o CCAH, o benzo[a]pireno podia ser utilizado, até à data, como marcador relativamente à ocorrência e ao efeito de PAH cancerígenos nos géneros alimentícios. No entanto num parecer de Dezembro de 2002, o CCAH recomendou que seriam necessárias mais análises sobre a proporção relativa destes PAH's nos alimentos para uma futura revisão da adequabilidade de manter o benzo[a]pireno como marcador [3, 4].

Deste modo, em 9 de Junho de 2008, o Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar da AESA, concluiu que o benzo[a]pireno não era um marcador adequado para a ocorrência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos alimentos e que um sistema de quatro substâncias específicas (4PAH⁽¹⁾) ou de oito substâncias específicas (8PAH⁽²⁾) representaria os indicadores mais adequados dos PAH's nos alimentos.

Com base nas conclusões da AESA, não foi possível manter o sistema de utilização do benzo[a]pireno como único marcador para o grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Por conseguinte, foi necessária uma alteração do Regulamento (CE) nº 1881/2006. Desta forma foram introduzidos teores máximos para a soma de quatro substâncias (4PAH) (Benzo[a]pireno, Benz[a]antraceno, Benzo [b]fluoranteno e Criseno), mantendo, no entanto, um teor máximo diferenciado para o Benzo[a]pireno. Este teor máximo diferenciado para o Benzo[a]pireno foi mantido para assegurar a compatibilidade com dados anteriores e futuros [3].

¹ Benzo[a]pireno, Benz[a]antraceno, Benzo [b]fluoranteno e criseno

² Benzo[a]pireno, Benz[a]antraceno, Benzo [b]fluoranteno e criseno Benzo[k] fluoranteno Dibenz[a,h]antraceno Indeno[1,2,3-cd]pireno

Na tabela 1 estão representados os valores dos teores máximos de PAH's anunciados na comissão de Agosto de 2011 - Regulamento (UE) nº 835/2011 - que alterou o anterior regulamento de 2006 , no que diz respeito aos teores máximos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nos géneros alimentícios [4].

Tabela 1 - Teores máximos de PAH's aplicados a géneros alimentícios, retirado da ref.^a [3]

Géneros Alimentícios	Teores máximos (µg/kg)	
	Benzo[a]pireno	Soma de Benzo[a]pireno, Benz[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno e Criseno
Óleos e gorduras (com excepção da manteiga de cacau e do óleo de coco) destinados ao consumo humano directo ou à utilização como ingredientes alimentares	2,0	10,0
Grãos de cacau e produtos derivados	5,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2013	35,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2013 até 31.3.2015 30,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2015
Óleo de coco destinado ao consumo humano directo ou como ingrediente alimentar	2,0	20,0
Carne fumada e produtos à base de carne fumada	5,0 até 31.8.2014 2,0 a partir de 1.9.2014	30,0 a partir de 1.9.2012 até 31.8.2014 12,0 a partir de 1.9.2014
Parte comestível de peixe fumado e produtos da pesca fumados (25) (36), com excepção dos produtos da pesca enumerados nos pontos 6.1.6 e 6.1.7. Para os crustáceos fumados, o teor máximo aplica-se à parte comestível dos apêndices e do abdómen (44). No caso dos caranguejos e crustáceos similares (Brachyura e Anomura) fumados, aplica-se à parte comestível dos apêndices	5,0 até 31.8.2014 2,0 a partir de 1.9.2014	30,0 a partir de 1.9.2012 até 31.8.2014 12,0 a partir de 1.9.2014
Espadilhas fumadas e espadilhas fumadas em lata (25) (47) (sprattus sprattus); moluscos bivalves (frescos refrigerados ou congelados) (26); carne tratada termicamente e produtos à base de carne tratada termicamente (46) vendidos ao consumidor final	5,0	30,0
Moluscos bivalves (36) (fumados)	6,0	35,0
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (3)(29)	1,0	1,0
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição (8)(29)	1,0	1,0
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos (9)(29), especificamente destinados a lactentes	1,0	1,0

2.1. Introdução aos PAH's

Nos últimos anos tem-se vindo a verificar uma maior preocupação no controlo dos poluentes orgânicos pela comunidade científica, nomeadamente com os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Os PAH's constituem uma diversificada família de contaminantes orgânicos lipofílicos amplamente distribuídos nos ecossistemas. São moléculas orgânicas muito estáveis, emitidas por fontes naturais e antropogénicas, sendo estas últimas as que representam o principal processo de produção destes compostos [5].

Os primeiros estudos de PAH's realizaram-se no ano de 1775, em Londres, por Percival Pott, que descobriu que existiam compostos que podiam originar efeitos malignos, nomeadamente cancro. Percival Pott reparou que os trabalhadores que limpavam as chaminés tinham maior incidência de cancro e deduziu assim que a fuligem causada pelo fumo seria responsável pelo cancro. Nessa altura ainda não era possível determinar quais os compostos responsáveis por essa causa. Os primeiros trabalhos de P. Pott foram publicados em 1808, o que fez aumentar a pesquisa de compostos que poderiam originar cancro.

As seguintes investigações e descobertas importantes nesta área ocorreram sensivelmente 150 anos depois. Em 1920 investigadores quando japoneses descobriram que os tumores da pele podem ser gerados em ratos submetidos ao alcatrão.

Inicialmente, os PAH's começaram por ser isolados do alcatrão. Em 1929 o primeiro composto puro carcinogénico isolado foi o Dibenzo[a,h]antraceno D[ah]A, isolado de extracto de fuligem no “ Chester Beatty Research Institute” pelo Sr. Kennaway.

Em 1953 estudos estatísticos provaram que o fumo do cigarro é a causa primária de cancro do pulmão. Estudos criteriosos da análise do fumo do tabaco revelaram que este contém muitos PAH's carcinogénicos, dos quais o B[a]P foi considerado o composto mais perigoso.

A partir daqui e até aos nossos dias os conhecimentos sobre os PAH's aumentaram de forma significativa. Actualmente os PAH's são alvo de monitorizações constantes em matrizes biológicas e ambientais.

Como foi referido, a importância desta classe de compostos orgânicos reside, principalmente, no carácter carcinogénico de alguns dos seus membros, mas também na sua facilidade de adaptação no meio ambiente, e consequentemente nos alimentos, que torna a exposição humana inevitável.

Os PAH's são constituídos pela fusão de dois ou mais anéis aromáticos, contendo, por definição, apenas carbono e hidrogénio [6]. Integram um grupo mais lato, os compostos aromáticos policíclicos, que incluem PAH's contendo grupos hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi ou cloro ligados aos anéis da unidade estrutural básica [7]. Os átomos de carbono dos anéis benzénicos podem ainda ser substituídos por azoto (azo-PAH's), enxofre (tio-PAH's) e oxigénio (oxo-PAH's). Estes análogos heterocíclicos têm origem similar aos PAH's, ocorrem com estes no ambiente (geralmente em concentrações muito inferiores) [8] e possuem propriedades e comportamento químico semelhantes. Os PAH's podem ainda dividir-se em leves ou pesados consoante o número de anéis benzénicos que apresentam e consequentemente a sua massa molecular.

Até à data, mais de 100 PAH's foram caracterizados na natureza, 16 dos quais foram classificados pela *Environmental Protection Agency*, EPA, como poluentes prioritários (Figura 3).

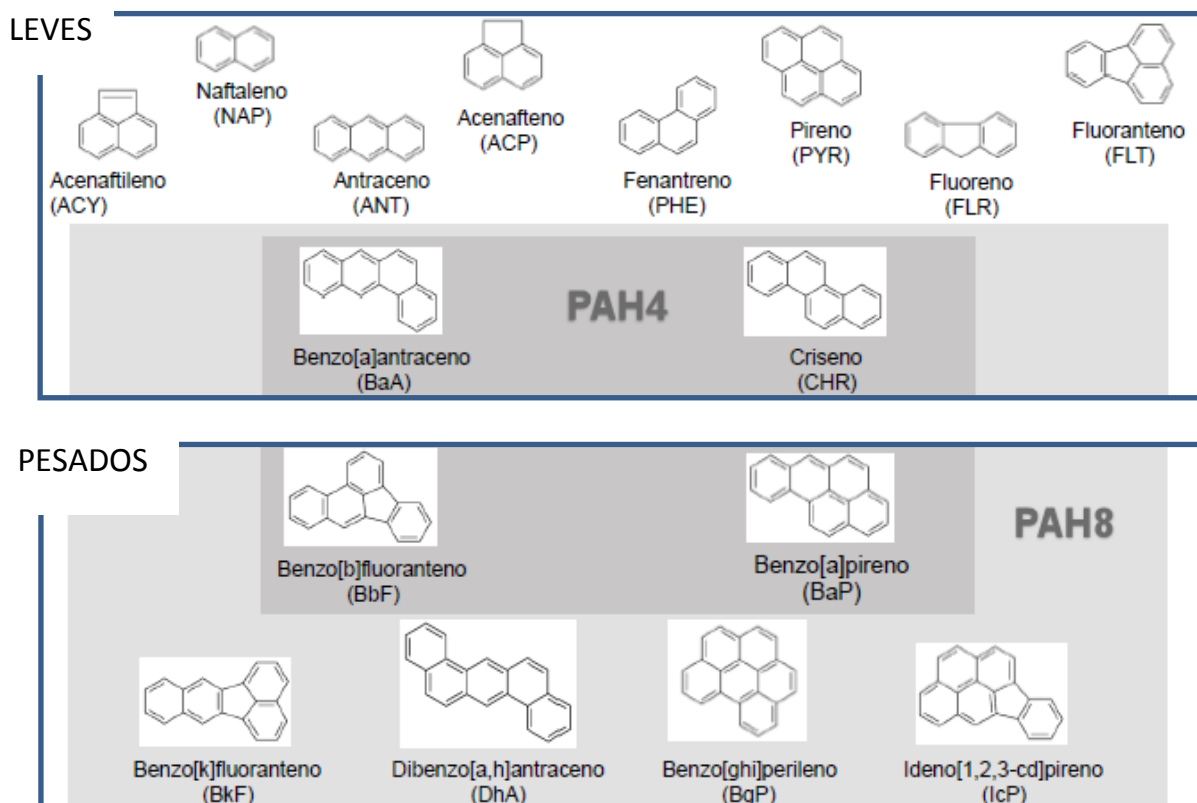


Figura 3 - Representação da estrutura molecular dos 16 PAH's considerados poluentes prioritários pela EPA (adaptado de [9])

Na tabela 2 apresentam-se os PAH's classificados como "prováveis carcinogêneos humanos", bem como, quando disponível, a sua estimada potência relativa, de acordo com a EPA [10]. Deste grupo, o benzo[a]pireno e o dibenz[a,h]antraceno são referenciados como os mais carcinogêneos [9].

Tabela 2 – Prováveis PAH's carcinogêneos humanos e potência relativa estimada

Hidrocarboneto Aromático Policíclico	Ordem de grandeza da potência relativa
Benzo[a]pireno	1,0
Benz[a]antraceno	0,1
Benzo [b]fluoranteno	0,1
Benzo [j] fluoranteno	-
Benzo[k] fluoranteno	0,01
Criseno	0,001
Ciclopenta[cd]pireno	-
Dibenz[a,h]antraceno	1,0
Dibenzo[a,e]fluoranteno	-
Dibenzo[a,e]pireno	-
Dibenzo[a,h]pireno	-
Dibenzo[a,i]pireno	-
Dibenzo[a,l]pireno	-
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,1

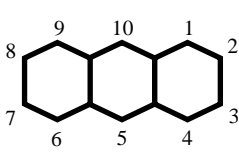
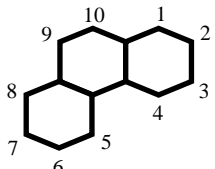
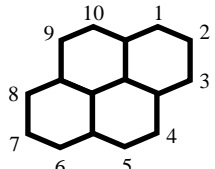
O **Benzo[a]antraceno**, **Benzo[b]fluoranteno** , **Benzo[a]Pireno** e o **Criseno** ocupam, respectivamente, o 4º, 5º, 6º e 8º lugar na lista de compostos prioritários publicada pela EPA [10]. Esta lista foi elaborada com base nas seguintes características:

- Existência de mais informação sobre estes compostos;
- Suspeitos de serem mais nocivos do que os restantes;
- Exibirem efeitos nocivos que são representativos de todos os outros;
- Grande probabilidade de estarmos expostos a estes compostos.

2.1.1. Estrutura química e nomenclatura

Os PAH's são compostos por átomos de hidrogénio e carbono constituídos por dois ou mais anéis aromáticos. A fusão entre os anéis aromáticos pode ser linear (com todos os anéis em linha), angular (com anéis em escada) ou condensada (pelo menos um dos anéis rodeado em 3 lados) (tabela 3) [6]. A estabilidade da molécula difere consoante o tipo de arranjo molecular, sendo a fusão linear a menos estável e a fusão angular a mais estável [6].

Tabela 3 – Tipo de fusão dos PAH's

		
Fusão Linear (antraceno)	Fusão angular (fenantreno)	Fusão condensada (pireno)

A nomenclatura dos PAH's é orientada de forma ao maior número de anéis ficar na horizontal, o C1 corresponde ao carbono mais em cima que não está envolvido na ligação e a numeração segue o sentido dos ponteiros do relógio. A ligação C1-C2 designa -se de "a" e as ligações seguintes seguem a ordem alfabética.

De acordo com a natureza dos seus anéis, os PAH's podem ser classificados em alternantes ou não alternantes. Alternantes quando são constituídos pela fusão de anéis benzénicos a uma molécula de benzeno e não alternantes no caso da estrutura conter unidades anelares com diferente número de átomos de carbono [8].

Estes compostos, mesmo os de peso molecular mais baixo, têm um elevado número de isómeros, o qual depende essencialmente do número de anéis benzénicos. Esta diversidade resulta da peculiaridade das suas ligações, da possibilidade de formação de derivados alquilados e substituídos (grupos alquilo, hidroxilo, amino, etc.) e da substituição de um, ou mais, átomos de carbono dos anéis benzénicos por oxigénio, azoto ou enxofre. Todos estes factores fazem com que as misturas de PAH's, resultantes de uma combustão, por exemplo, sejam normalmente muito complexas.

2.1.2. Características físico-químicas

As características físico-químicas são importantes não só para percebermos o comportamento ambiental e biológico que caracterizam o grupo dos PAH's, como também se torna uma mais valia para uma remoção eficiente destes compostos no óleo vegetal durante o processo de refinação. Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam massas moleculares (MM) relativamente elevadas [11], quanto mais complexa a sua estrutura mais elevada é a massa molecular como é o caso do indeno[1,2,3-cd]pireno (MM= 276,34 g/mol) e do dibenzo[a,h]pireno (MM= 302,36 g/mol) [12].

Os PAH's podem apresentar-se na natureza na forma sólida cristalina ou na forma líquida e serem incolores ou de cores variadas [6]. À temperatura ambiente são, geralmente, sólidos e têm baixa volatilidade [7], podem, no entanto, sublimar ligeiramente, em condições normais [12].

As suas propriedades físicas, como a temperatura de fusão, temperatura de ebulição, a pressão de vapor e a solubilidade em água dependem, entre outros factores, da sua massa molecular, da estrutura e do grau de insaturação. De uma forma geral, estes compostos apresentam baixa solubilidade em água (da ordem dos µg/kg) [13], temperaturas de fusão e de ebulição elevadas e baixa pressão de vapor.

Um aumento da massa molecular, isto é, maior n.º de anéis aromáticos, revela-se numa diminuição da solubilidade em água e menor pressão de vapor e num aumento das temperaturas de fusão e de ebulição. A sua baixa pressão de vapor, faz com que os PAH's se encontrem frequentemente ligados à matéria particulada do ar, nomeadamente às partículas de exaustão de motores [14].

Estes compostos são altamente lipossolúveis, o que significa que são solúveis em gordura e em particular em óleos vegetais, surgindo assim a necessidade de os eliminar.

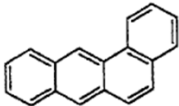
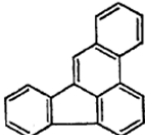
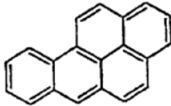
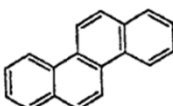
A presença de agentes oxidantes, em particular do oxigénio, induz um aumento significativo na velocidade de degradação dos PAH's. A maioria destes hidrocarbonetos pode ser foto-oxidada e degradada a substâncias mais simples [7], sendo a luz ultravioleta mais eficiente. No entanto, esta sensibilidade à luz não é uniforme para todos os PAH's: enquanto uns são particularmente fotossensíveis, outros não são afectados.

O benzo[a]pireno é o exemplo de um composto onde o aumento da intensidade luminosa, da concentração de oxigénio e da temperatura, mas não do pH e da força iónica, aceleram a sua degradação.

Devido a este comportamento peculiar dos PAH's face à sua sensibilidade à degradação, as suas concentrações relativas no meio ambiente muitas vezes não reflectem exactamente as concentrações em que foram formados.

Na tabela 4 estão representadas as principais propriedades físico-químicas dos 4 hidrocarbonetos aromáticos estudados neste trabalho.

Tabela 4 - Principais propriedades físico-químicas dos 4 PAHs estudados, adaptado ref[15]

Composto	Benzo[a]antraceno (BaA)	Benzo[b]fluoranteno (BbF)	Benzo[a]Pireno (BaP)	Criseno (Chr)
Estrutura Química				
Fórmula Molecular	C ₁₈ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₁₈ H ₁₂
Massa Molecular (g/mol)	228,30	252,32	252,32	228,30
Nº CAS	56-55-3	205-99-2	50-32-8	218-01-9
Temperatura de Fusão(°C)	158,0	168,0	178,1	257,0
Temperatura de Ebulição (°C)	435,0	481,0	496,0	448,0
Coefficiente de partição octanol/água K _{ow} (log L/kg)	5,61	6,04	6,06	5,52
Densidade (20°C)	1,274	-	1,351	1,282
Solubilidade na água a 20-25 °C (mg/L)	0,014	0,0015	0,0038	0,002
Pressão de vapor a 20-25 °C (mmHg)	1,54E ⁻⁰⁷	8,06E ⁻⁰⁸	4,89E ⁻⁰⁹	7,8E ⁻⁰⁹
Constante de Henry a 20 °C (kPa m ³ /mol)	1,39E ⁻⁰⁴	4,99E ⁻⁰⁴	4,70E ⁻⁰⁵	5,03E ⁻⁰⁵
Coefficiente de Difusão no ar (cm ² /s)	0,051	0,023	0,043	0,025
Coefficiente de Difusão na água (cm ² /s)	9,0E ⁻⁰⁶	5,56E ⁻⁰⁶	9,0E ⁻⁰⁶	6,21E ⁻⁰⁶

2.1.3. Formação

A origem dos PAH's está na combustão incompleta e pirólise da matéria orgânica e de combustíveis fósseis [7]. A temperaturas elevadas, os compostos orgânicos são parcialmente quebrados em fragmentos instáveis (pirólise), na maioria radicais, que se recombina para originar PAH's relativamente estáveis (pirossíntese).

Entre as diversas fontes emissoras destes contaminantes, encontram-se vários processos que envolvem combustão incompleta de combustíveis fósseis. Estes podem ser de fontes naturais ou fontes antropogénicas. A contribuição das fontes naturais é muito limitante restringindo-se praticamente a emissões de vulcões e fogos florestais, processos geotérmicos [13], infiltrações naturais de petróleo e biossíntese, *in situ*, a partir de material biológico em degradação. As fontes antropogénicas mais importantes incluem indústrias de produção/consumo de carvão, alcatrão e asfalto, fábricas de gaseificação de carvão, incineradoras, indústrias de produção de alumínio, fumos de exaustão de veículos motorizados (máquinas de combustão interna), fogos a céu aberto (queima doméstica ou industrial de lixo domésticos e fogos florestais, acidentais ou deliberados), produção de energia eléctrica, aquecimento caseiro e derrames e descargas de petróleo [7]. O desenvolvimento industrial é responsável pelo grande aumento das emissões antropogénicas, sendo estas de longe a maior fonte de emissão de PAH's [12]. Calcula-se que, desde a Revolução Industrial, a velocidade de deposição dos PAH's exceda a de degradação e, conseqüentemente, os PAH's se acumulem, de forma significativa, no ambiente.

Estes processos originam, regra geral, misturas de um elevado número de compostos aromáticos policíclicos de grande complexidade química [13]. A formação de PAH's é favorecida por elevadas temperaturas (combustão entre 500 e 900°C - particularmente acima de 700°C) [14]. No entanto, a aromatização também pode ocorrer a temperaturas inferiores (100-150°C), como no caso da génese de combustíveis fósseis. A combustão a temperaturas muito elevadas resulta em misturas relativamente simples de PAH's de baixo peso molecular, não alquilados. Pelo contrário, processos que envolvam temperaturas mais baixas, originam misturas mais complexas, com grande predomínio dos derivados de alquilo [13]. Neste caso, a formação de grupos aromáticos desenrola-se a uma velocidade menor e a fragmentação dos grupos alquílicos é menos favorecida [6,8].

Outro parâmetro fundamental para o espectro de substâncias obtidas é a razão oxigénio(comburente)/combustível. Geralmente, a formação de PAH's é favorecida na razão inversa desta relação.

Consoante as diferentes fontes, os PAH's apresentam padrões muito característicos, pelo que a análise da composição química das misturas destes compostos permite decifrar, com alguma certeza, as suas origens. Com base neste conhecimento, e uma vez que as fontes antropogénicas podem ser monitorizadas e controladas, é possível estabelecer medidas para eliminar ou minimizar essas descargas para o ambiente.

Com base nisto, a União Europeia tem feito esforços para monitorizar a emissão de PAH's a nível industrial para o ambiente através do REEP. No ano de 2004 as emissões de PAH's para o ar e para a água como consequência da actividade industrial são os apresentados nos gráficos 1 e 2. Segundo dados do REEP o país responsável pela maior emissão de PAH's é a Polónia.

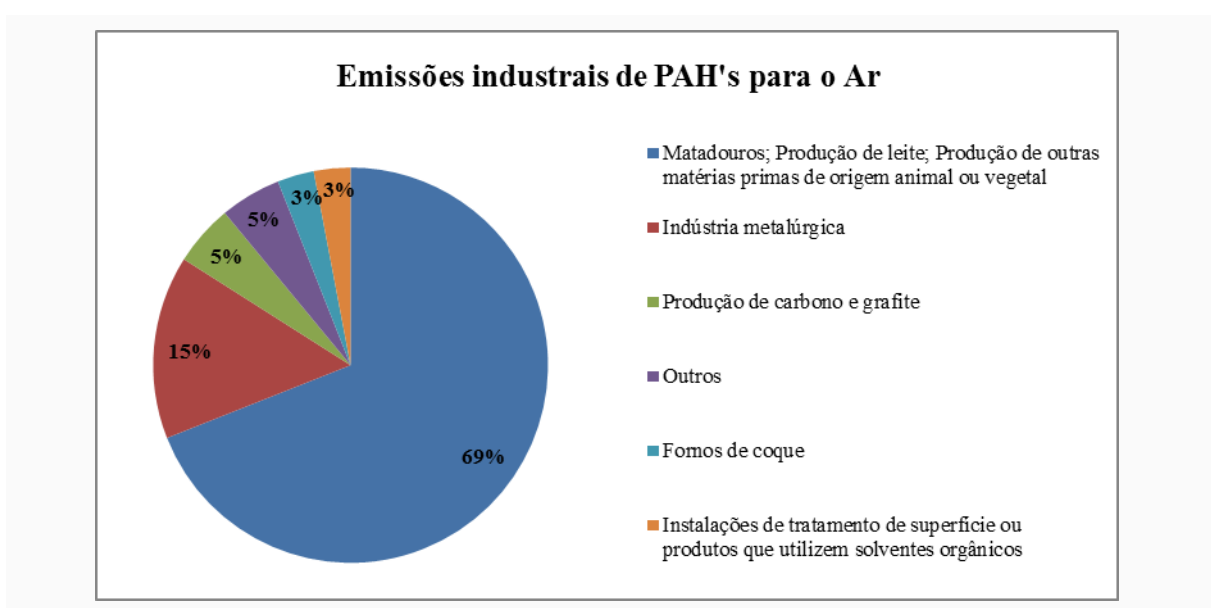


Gráfico 1 – Origem das emissões industriais de PAH's para o Ar [16]

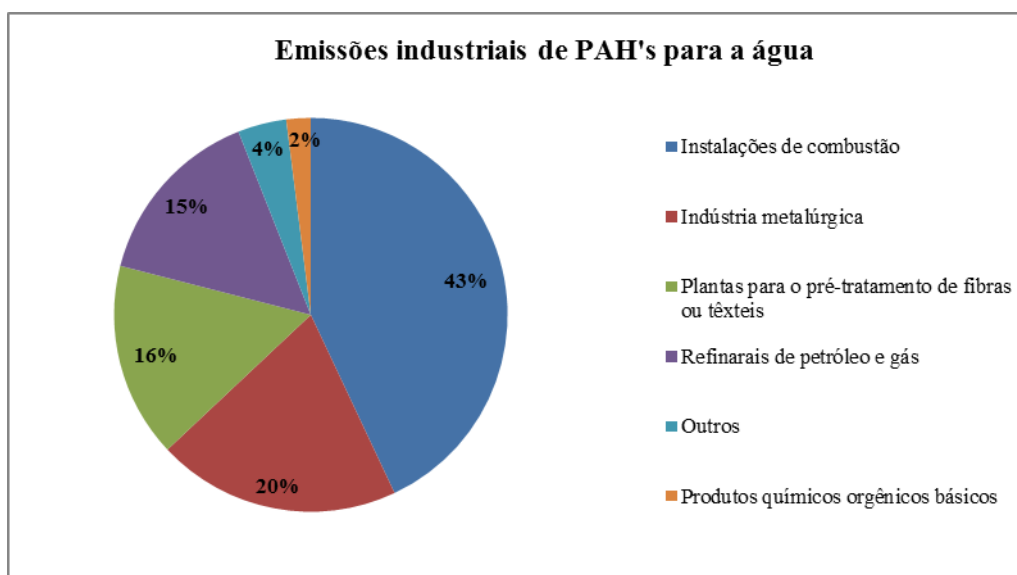


Gráfico 2 – Origem das emissões industriais de PAH's para a água [16]

A retenção dos PAH's na fase de vapor e a consequente deposição destes ligando-se a partículas, torna a poluição atmosférica a principal responsável pela presença destes nos alimentos não processados [12]. Este movimento global dos PAH's está esquematizado na figura 4 e pode ser resumido da seguinte maneira: Os PAH's libertados na atmosfera são sujeitos a transporte de curto e longo alcance e são removidos através da deposição em solos e sedimentos, água ou vegetação.

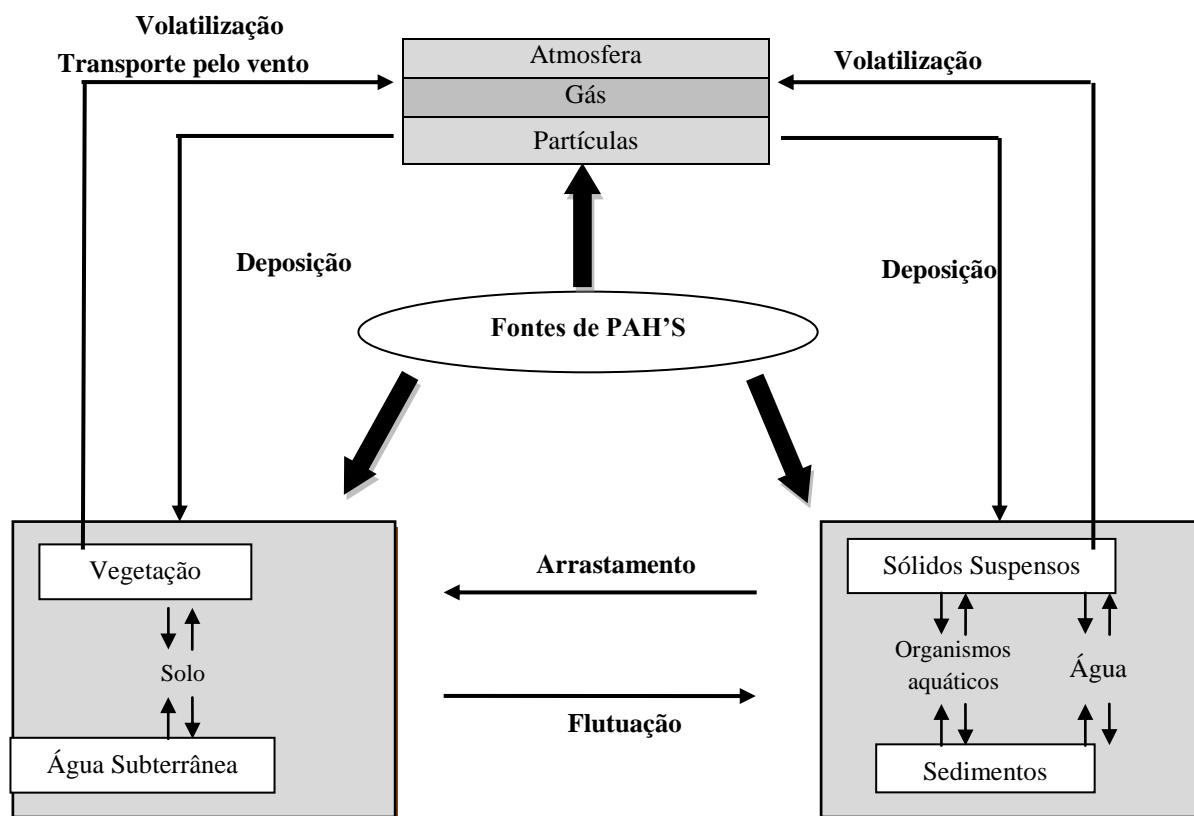


Figura 4 – Representação esquemática do movimento global dos PAH's no meio ambiente [17]

Os PAH's são persistentes no meio ambiente, adsorvem rapidamente ao solo e quando libertados na água adsorvem fortemente aos sedimentos e/ou à matéria orgânica. São bioacumuláveis, especialmente nos organismos aquáticos. Devido às suas propriedades físico-químicas, os PAH's tendem a acumular-se no meio ambiente das formas apresentadas na tabela 5, à qual estão sujeitos a diferentes processos de degradação natural.

Tabela 5 – Processos de degradação de PAH's em diferentes matrizes

Matriz	Acumulação	Degradação
Água superficial	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas suspensas • Organismos aquáticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Volatilização • Fotoxidação • Oxidação • Biodegradação
Sedimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Organismos aquáticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Fotoxidação • Biodegradação
Solo	<ul style="list-style-type: none"> • Plantas • Partículas 	<ul style="list-style-type: none"> • Volatilização • Fotoxidação • Oxidação • Biodegradação

Por outro lado nos géneros alimentícios processados, para além da inevitável contaminação ambiental, existem outras potenciais fontes de PAH's, como a contaminação durante o processamento tecnológico e os tratamentos térmicos utilizados na sua preparação. Alguns métodos de conservação, como a secagem e a fumagem, também contribuem para a contaminação dos alimentos com PAH's. Em particular, a secagem, por aquecimento directo, dos alimentos pode originar PAH's. De igual forma, práticas culinárias que envolvam temperaturas elevadas, como assar, fritar, grelhar na grelha ou no churrasco [14,18] directamente sobre chamas ou carvão, contribuem para aumentar o teor carcinogénico dos alimentos, de forma proporcional ao tempo de cozedura, ao teor lipídico dos alimentos e à proximidade da fonte calorífica.

Podemos concluir, que existe uma multiplicidade de fontes e vias de exposição aos PAH's, pelo que o contacto humano com estes poluentes torna-se inevitável, suscitando bastantes preocupações em termos de saúde pública.

2.2. Degradação de PAH's

Quando estão inseridos no meio ambiente os PAH's podem sofrer biodegradação, nomeadamente processos de fotoxidação, oxidação (química e avançada) e volatilização. O tempo necessário para que estes processos ocorram de forma espontânea, depende do estado físico e do material ao qual estão adsorvidos os PAH's, podendo variar entre horas e anos.

A degradação biológica é uma alternativa para a remoção destes compostos do ambiente, que faz uso do potencial metabólico dos microrganismos – fungos e bactérias.

Apesar de a biodegradação ser a principal via de eliminação dos PAH's no solo e sedimentos. A degradação dos PAH's no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos. A interacção entre moléculas e iões ou a excitação de átomos por efeito da luz e da temperatura conduzem a desestabilização da estrutura das moléculas e ao rompimento das ligações. No entanto, estes processos são lentos e incompletos.

Adsorção com Carvão Activado

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos muitos estudos sobre a distribuição dos poluentes no meio ambiente. Muitos dos modelos de equilíbrio desenvolvidos estimam que a adsorção de contaminantes orgânicos se fizesse, de forma simplificada, através de uma isotérmica linear e reversível. No entanto, esta simplificação mostra-se inadequada quando se considera a ocorrência de dessorção.

Os poluentes orgânicos possuem propriedades físicas e químicas diferentes. Têm variados graus de hidrofobicidade, muitos deles são resistentes à dessorção, outros têm uma dessorção extremamente lenta, podendo levar meses ou até anos a dessorverem por completo do solo ou dos sedimentos.

Os processos de dessorção dos contaminantes orgânicos são caracterizados normalmente por duas fases distintas, uma com uma rápida velocidade de dessorção e outra posterior de baixa velocidade de dessorção, sugerindo a possibilidade de haver uma fracção de soluto irremediavelmente ligada ao solo ou ao sedimento [19].

A utilização de carvão activado como adsorvente de poluentes orgânicos é muito eficiente, devido às suas excelentes propriedades, nomeadamente, a elevada área superficial, estrutura porosa, elevada capacidade de adsorção e a natureza química da sua superfície. Na SOP a adsorção e consequente degradação de PAH's durante o processo de refinação é feita através de carvão activado.

As matérias-primas mais comuns na produção do carvão activado são:

- Carvão betuminoso
- Ossos
- Casca de coco
- Turfa
- Casca de noz
- Resíduos de petróleo
- Açúcar
- Madeira
- Caroço de azeitona
- Caroço de pêssego

O carvão activado apresenta uma estrutura complexa com diferentes tamanhos de poros, uma variedade de grupos funcionais na superfície, impurezas e irregularidades. A sua estrutura é constituída por átomos de carbono, ordenados em camadas hexagonais paralelas, intensamente vinculados por ligações tetraédricas. Dois métodos são normalmente aplicáveis na sua fabricação: métodos físicos, que envolvem o aquecimento do material em atmosfera inerte (pirólise) a elevadas temperaturas e subsequente activação com corrente de gases (CO_2 , H_2O , etc.) e métodos químicos, em duas etapas, que consistem em impregnar o material com reagentes activantes e submete-los ao aquecimento em atmosfera inerte (pirólise).

É importante destacar que, diante de uma aplicação específica de um determinado carvão activado, devem ser consideradas as características físico-químicas do mesmo e também as características do adsorbato (natureza química e pH por exemplo).

São várias as marcas de carvão activado que existem no mercado [19] - AgriTecSorbents, LCC, Chemviron Carbon, Ltd. e Norit Nederland B.V. – promovedoras da remoção de PAH's de óleos e gorduras vegetais. Nas tabelas 8, 9 e 10 encontram-se as suas principais características.

Tabela 6 - Características gerais de AgriTecSorbents AgriCarb DC 600 [19]

Características gerais de AgriTecSorbents AgriCarb DC 600	
Número de iodo (mg/g)	625 min
Eficiência de descoloração (%)	95 min
Índice de descoloração	20 min
Humidade (%)	8 max
pH	7 – 9
Solúveis em água (%)	1 max
Densidade aparente	391
Área de superfície (m ² /g)	600
Análise Granulométrica:	
MESH 100 (150 µm) (%)	95 – 100
MESH 200 (75 µm) (%)	85 – 95
MESH 325 (45 µm) (%)	80 – 90

Tabela 7 - Características gerais de Chemviron Carbon [19]

Características gerais de Chemviron Carbon	
Área de superfície (m ² /g)	>950
Humidade (%)	<10
pH	9 – 11
Cinza (%)	<15
Densidade aparente	350 – 450
Análise Granulométrica:	
MESH 325 (45 µm) (%)	65 – 85

Tabela 8 - Características gerais de Norit SA 4 PAH-HF [19]

Características gerais de Norit SA 4 PAH-HF	
Índice de adsorção de PAH's leves	5,1
Índice de adsorção de PAH's pesados	11,0
Área de superfície total (BET) (m ² /g)	1150
Tamanho de partículas D ₁₀ (µm)	7
Tamanho de partículas D ₅₀ (µm)	34
Tamanho de partículas D ₉₀ (µm)	100
Tempo de filtração (min)	8
Densidade aparente	530
Teor de cinzas (% de massa)	12
Cloreto (ácido extraído) (% de massa)	0,1
Humidade (% de massa)	2
pH	Alcalino

O carvão activado utilizado para a purificação e degradação de PAH's no óleo durante o processo de refinação, é, normalmente carvão em pó. Não é muito frequente o uso de carvão activado granular pois gera limitações operacionais. Mais à frente neste trabalho descreve-se mais em pormenor este processo.

A melhor solução para a degradação de um determinado composto ou conjunto de poluentes não tem de passar obrigatoriamente pela aplicação de um único processo de tratamento.

A alternativa é estudar as vantagens e desvantagens de cada processo, a reformulação de diferentes combinações de métodos de degradação e proceder a ensaios experimentais com o objectivo de avaliar a aplicabilidade do tratamento à escala industrial [20].

Na avaliação de cada processo de tratamento devem ser tidos em conta diversos factores tais como:

- Eficiência de degradação
- Aumento da biodegradação
- Custos
- Produção de resíduos

2.3. A alimentação como fonte de exposição a PAH's

A forma como os PAH's se distribuem no ambiente em geral, e nos alimentos em particular, suscita alguma apreensão. A contaminação de rios, mares, florestas, e também da atmosfera, pode causar danos irreparáveis à natureza e à saúde humana. Para além de serem poluentes ambientais, destacam-se outras preocupações que têm directamente a ver com as suas propriedades toxicológicas para os humanos.

Apesar de *à priori* a contaminação humana com PAH's parecer tratar-se de um problema de contaminação ambiental, há estudos que não confirmam apenas isso. Com o intuito de verificar essa situação, foram realizadas, numa série de países, estimativas da exposição humana a PAH's, a partir de padrões de consumo alimentar [11]. Da análise dos resultados desses estudos, pode-se verificar que as estimativas feitas são bastante semelhantes. As pequenas diferenças dos vários estudos podem dever-se a discrepâncias nos hábitos alimentares entre os diversos países, na avaliação da importância relativa dos componentes alimentares, na selecção de dados analíticos publicados e na metodologia analítica utilizada [8].

Da análise dos resultados destas investigações, sobressai a importância da alimentação como veículo privilegiado deste grupo de químicos. Conclui-se que para não fumadores e indivíduos não expostos profissionalmente aos PAH's, os alimentos são considerados a maior fonte de exposição, devido à formação de PAH's durante a fritura e a deposição atmosférica.

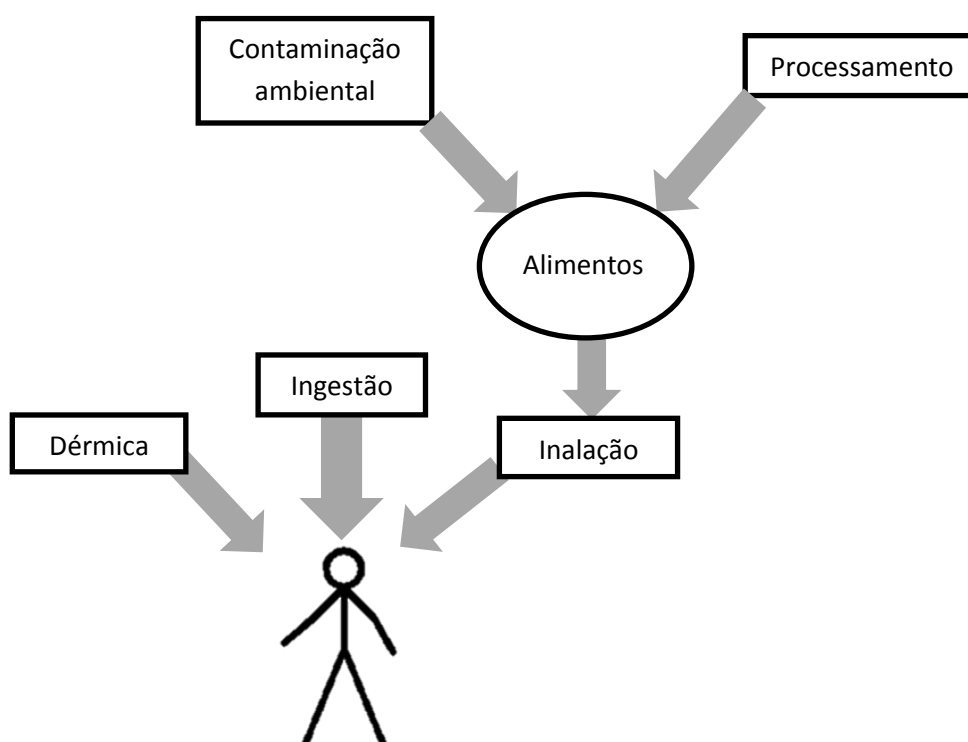


Figura 5 – Exposição aos PAH's

A Academia Nacional de Ciências americana [21], foi, entre muitas, uma das instituições que realizou estes estudos e como seria de esperar devido ao carácter hidrofóbico dos PAH's, a água não é uma fonte de exposição importante destes compostos. Um estudo efectuado em Itália apresentou resultados no mesmo sentido, indicando que a ingestão alimentar de PAH's é de uma ordem de grandeza superior à inalada com as partículas de ar citadino poluído. O resultado destes três estudos encontra-se no gráfico seguinte.

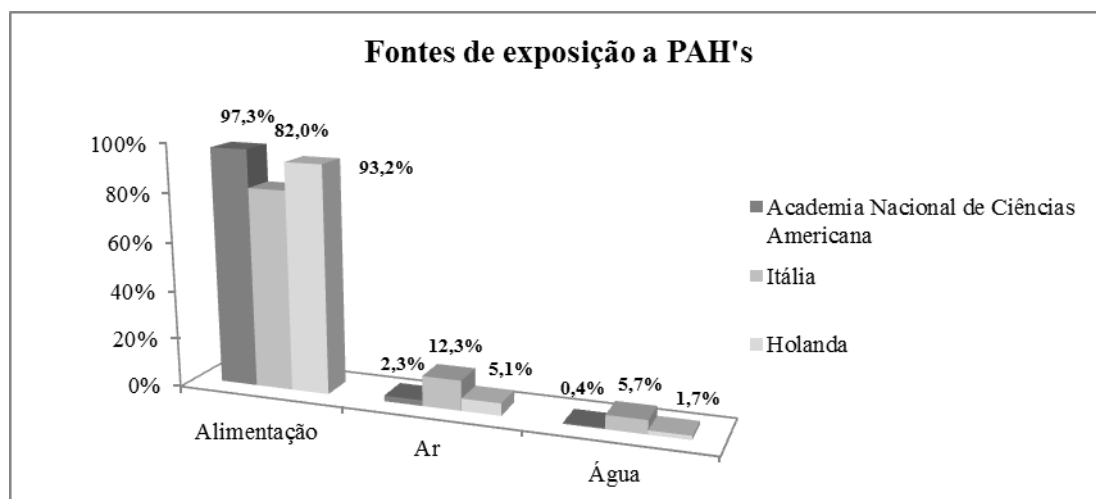


Gráfico 3 – Ingestão média diária de PAH's [21]

Esta quantidade de estudos representativos indica que para a população em geral, a alimentação constitui a principal fonte de exposição humana a PAH's ambientais. As doses inconscientemente ingeridas na alimentação, parecem ser suficientes para causar inquietação, justificando um olhar atento da comunidade científica.

Os PAH's podem ser encontrados em diferentes grupos de alimentos e bebidas incluindo águas, vegetais, frutas, carnes, óleos e gorduras, cereais e derivados, produtos lácteos, café, chá, entre outros. Podem também ser detectados em alimentos brutos e processados. O grau de contaminação varia de acordo com o modo como os alimentos são processados, preservados e armazenados.

Esta importante atribuição ao géneros alimentícios como fonte de exposição aos PAH's deve-se tanto à formação de PAH's durante o processo de preparação dos alimentos (cozimento, defumação, fritura), quanto devido à inevitável presença de PAH's que está associada aos alimentos *in natura*, devido à deposição atmosférica, no caso dos alimentos brutos de origem vegetal (grãos, vegetais e frutas).

Em 2006, um estudo realizado em Catalunha, Espanha, [22] mostra que, as maiores concentrações de PAH's totais em grupos alimentares foram detectados em carnes e derivados (25,6 mg/kg), óleos e gorduras (23,5 mg/kg) e cereais (20,4 mg/kg). Para um homem adulto médio (70 kg de peso corporal),

a soma de PAH's de corrente da ingestão alimentar registou-se em 12,0 µg/dia/pp, mais elevado do que o encontrado na última pesquisa de 2000 (8,4 µg/dia/pp).

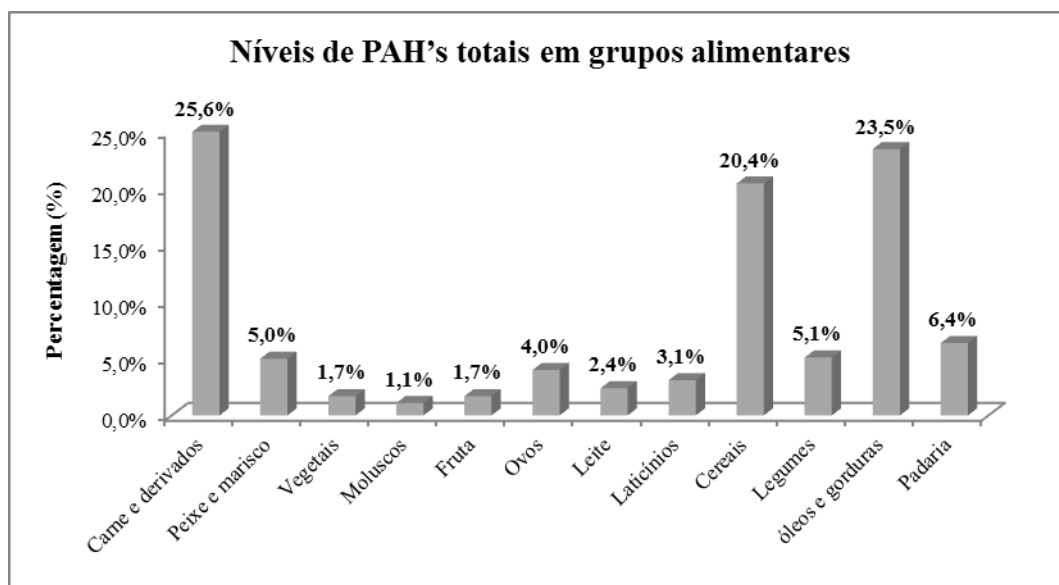


Gráfico 4 - Níveis de PAH's totais em grupos alimentares, Catalunha, Espanha [22]

Da análise destes trabalhos é possível observar resultados bastante próximos nas estimativas de exposição e nas concentrações nos diferentes tipos de alimentos. A maioria dos estudos [21,22,23,24] responsabiliza o elevado consumo de produtos cerealíferos, óleos e gorduras e açúcar/doces, pela contribuição maioritária da alimentação para a ingestão diária humana de PAH's. Embora alguns alimentos, como carne e peixe grelhados ou fumados e moluscos contaminados, possam conter concentrações elevadas de PAH's, o seu contributo em termos absolutos para a ingestão é pouco significativo, pois regra geral são consumidos em pequena escala [11]. Assim, e a menos que o consumo desses alimentos seja anormalmente frequente, os cereais e derivados e os óleos e gorduras parecem ser os maiores contribuintes para a exposição alimentar humana a PAH's.

Deste modo, ressalta-se a importância dos óleos vegetais como fontes de PAH's não apenas por si só, mas também pela influência que têm nos níveis elevados de PAH's em muitos doces e produtos cerealíferos, pelo facto de serem ingredientes em muitos deles.

Neste sentido, pode-se concluir que a redução da exposição humana a PAH's é inequivocamente vantajosa em termos de saúde pública e pode e deve ser alcançada, e depende de cada um de nós, ou seja, o Homem tem um papel activo na exposição a que está sujeito, o qual passa pela mudança de práticas culinárias na preparação, confecção e selecção dos alimentos que ingere e pelo controlo das emissões de PAH's que se traduzirão numa menor deposição atmosférica nos géneros alimentícios não processados.

2.4. Presença de PAH's nos óleos vegetais

Tendo em consideração que as gorduras e óleos vegetais são veículos importantes de PAH's na alimentação, o diagnóstico da presença destes contaminantes nestes alimentos tal como a avaliação de um possível risco carcinogénico para a população em geral torna-se um interesse de saúde pública primário e a Comunidade Científica tem dado a devida atenção a este facto, tendo dedicado muita pesquisa ao estudo da ocorrência de PAH's em óleos vegetais.

Os óleos vegetais, inicialmente livres de PAH's, podem ser contaminados por várias vias, tais como: a poluição atmosférica, a queima dos solos, a captação de PAH's dos solos pelas oleaginosas, a secagem directa dos grãos/sementes antes da extracção com gases de combustão, a transmigração de solos ou águas já contaminados com estes compostos.

Estima-se que a maior fonte de contaminação de óleos e gorduras é a combustão de origem antropogénica, pois a poluição atmosférica com poeira e matéria particulada, alberga grandes quantidades de PAH's, que se deposita sobre os campos agrícolas durante o período de crescimento das plantas, sendo que grande parte desta contaminação superficial se transfere para o produto final.

Apesar disso, as sementes têm baixos teores de PAH's no momento da colheita [8]. É plausível que as sementes possam ser contaminadas durante as operações de colheita, transporte e armazenamento e que, mesmo após purificação e secagem, algumas dessas impurezas se mantenham.

O processo de secagem directa das sementes destaca-se como um dos maiores responsáveis por aumentos consideráveis de PAH's em alguns tipos de óleos vegetais. Aliás, os elevados teores de PAH's detectados na maioria dos estudos para os óleos de coco devem-se ao habitual processo de secagem deste alimento. Um estudo realizado por Biernoth e Rost [25] revela que o teor em PAH's em óleos brutos obtidos a partir de coco fresco, em copra sujeita a secagem com ar quente e em copra sujeita a secagem por fumo, são bastante diferente, sendo respectivamente 24 µg/kg, 1783 e 2872 µg/kg.

O controlo das condições de combustão é claramente um factor a ter em conta quanto à contaminação com PAH's durante a secagem. Este mesmo estudo mostra que a secagem de sementes de colza, com recurso a gases de combustão (óleo, gasóleo ou propano), provocou aumentos médios entre 41 e 126% em teores de PAH's de baixo peso molecular, verificando-se um aumento pouco significativo em PAH's de maior peso molecular, como o B[a]P. Por outro lado, a secagem com ar (frio ou aquecido electricamente) não resultou num aumento do teor destes compostos.

Estudos realizados por Cejpek e colaboradores não confirmaram uma influência significativa do solvente de extração - hexano - nos teores de PAH's em óleos após a extração. Os níveis, relativamente maiores, de PAH's no óleo extraído, em relação ao expresso mecanicamente, pode dever-se à maior afinidade destes compostos pela matriz com impurezas sólidas na prensagem, sendo a maioria transferidos para a fase oleosa.

O tempo de armazenamento entre a colheita e o processamento propriamente dito, é outro factor que pode afectar substancialmente os teores de PAH's das sementes e consequentemente dos óleos a que dão origem. Cejpek verificou que as sementes de colza armazenadas em silos durante vários meses apresentavam níveis de contaminação significativamente inferiores (cerca de 50%) aos da matéria-prima processada pouco tempo após a colheita [14].

De uma forma geral, os resultados das concentrações de PAH's em óleos e gorduras disponíveis comercialmente revelam-se muito reduzidas, o que é explicado pela ocorrência de procedimentos durante o processo de refinação a que o óleo cru extraído das sementes está sujeito que diminuem ou eliminam a presença destes compostos no produto final [13]. Isto é, as concentrações de PAH's nos óleos vegetais brutos, preparados a maior parte das vezes a partir de sementes contaminadas por fontes ambientais, são reduzidas ou eliminadas durante a refinação, nomeadamente nas etapas de branqueamento e desodorização [19] como ilustrado na figura seguinte. Obviamente que se pode dar o caso do óleo cru proveniente do processo de extração não conter PAH's ou conter em concentrações muito reduzidas, nestes casos a figura seguinte não se aplica de forma tão evidente.

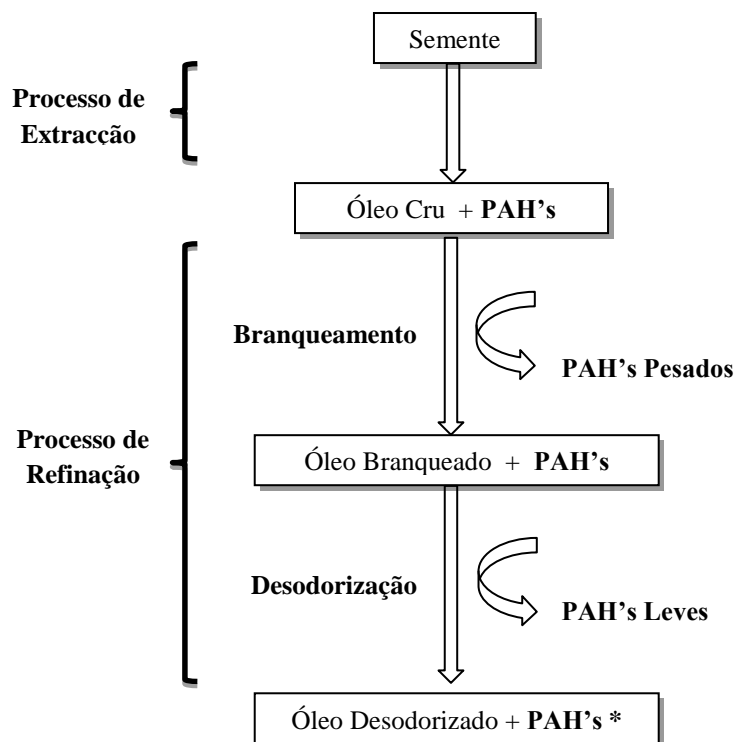


Figura 6 – Eliminação dos PAH's no processo de extracção e refinação. * PAH's eliminados ou reduzidos a níveis aceitáveis

Como foi referido, no capítulo 2.2, um modo de reduzir as concentrações de PAH's durante o processo de refinação é através da utilização de carvão activado, aliás, é este o método utilizado na SOP. Este tratamento é realizado na etapa de branqueamento, considerando-se uma acção suficientemente efectiva para a redução dos teores de PAH's com 5 e 6 anéis (PAH's pesados). Este método pode ser a explicação para as grandes reduções nas concentrações destes compostos do óleo bruto para óleo refinado.

Biernoth e Rost foram os primeiros a sugerir e desenvolver um procedimento de limpeza especial para remover PAH's em óleos vegetais que consistia na filtração através de carvão activado. Esta técnica foi utilizada primeiramente no óleo de coco, pois o teor em B[a]P neste pode atingir 50 µg/kg, enquanto que em muitos outros óleos vegetais não ultrapassa concentrações superiores a 1 µg/kg. Esta situação deve-se ao facto da polpa do coco, de onde o óleo é prensado, ser muitas vezes seca directamente com gases de combustão. Com recurso ao carvão activado, os níveis de PAH's foram reduzidos de 1923 µg/kg, em amostras de óleo de coco bruto, para 13 µg/kg, nos mesmos óleos desodorizados. Conclui-se que o processo de refinação pode, felizmente, reduzir drasticamente a quantidade destes contaminantes.

O tratamento com carvão activado adsorve principalmente PAH's condensados de massa molecular mais elevada (pesados). Por outro lado, o uso da desodorização a vapor elimina a maior parte dos PAH's de baixa massa molecular (leves), isto significa que estes dois tipos de tratamentos são complementares no seu efeito.

Existem diversos estudos feitos em óleos vegetais refinados disponíveis comercialmente, que revelam níveis destes compostos, na ordem dos ppb. Os hidrocarbonetos aromáticos mais frequentemente detectados têm sido o antraceno, o benz[a]antraceno, o criseno, o fluoranteno, o indeno[1,2,3-cd]pireno, o benzo[g,h,i]perileno, o pireno e o fenantreno. No entanto, ocasionalmente, aparecem níveis particularmente elevados destes compostos.

Muitos dos óleos comercialmente disponíveis resultam de uma mistura de óleos provenientes de diversas localizações. Esta mistura é apontada como um dos factores explicativos da homogeneidade dos níveis de contaminação encontrados em diferentes óleos.

2.5. Métodos analíticos de determinação de PAH's

Tendo em conta que os géneros alimentícios constituem uma via privilegiada de exposição a este grupo de compostos, para a qual os óleos vegetais podem contribuir e tratando-se a SOP de uma empresa produtora de óleos alimentares a determinação analítica da concentração de PAH's nestes géneros alimentícios tem uma importância significativa.

Deste modo, desde os anos 70, que foram desenvolvidos diversos procedimentos para a análise residual de PAH's, contudo a maioria é desadequada para análises de rotina, devido à sua complexidade e custo. Torna-se assim necessário desenvolver um método que seja simples, rápido, eficaz e mais económico, dado o número de amostras a analisar por dia.

2.5.1. Preparação da amostra

Os PAH's estão normalmente presentes em concentrações vestigiais nos alimentos, pelo que determinar quantitativamente a sua presença torna-se uma tarefa complicada. Deve-se ter o máximo cuidado para evitar contaminações adventícias, para além de que é necessário ter um especial cuidado no próprio manuseamento dos produtos alimentares.

Nesse sentido, é necessário proceder-se a um armazenamento adequado das amostras, pois os PAH's são contaminantes ubíquos no ambiente. Deve, também, evitar-se ao máximo o contacto com plásticos, optando pela utilização de material de vidro sujeito a uma limpeza rigorosa. Na medida em que se está a lidar com um grupo de compostos de volatilidade e solubilidade diferentes, de forma a se evitarem perdas indesejáveis, deve ter-se especial precaução, particularmente, nas etapas de evaporação de solventes, para minimizar as perdas dos PAH's mais voláteis, nomeadamente o Benzo[a]antraceno e o Criseno, que têm menor número de anéis benzénicos.

Um outro factor que é necessário ter em conta durante a colheita, armazenamento e posterior preparação, é a tendência dos PAH's para adsorverem às superfícies com que contactam, que pode resultar em grandes perdas destes compostos. A adição de solventes orgânicos à amostra permite, pelo aumento da solubilidade, minorar este problema. Um outro aspecto a ter em consideração, é o material de que é feito o recipiente que contém a solução de PAH's. Estudos anteriores realizados mostram que o polietileno acarreta perdas superiores comparativamente com o vidro [26].

No decorrer do processo analítico, a degradação de PAH's também deve ser tida em consideração, para evitar o mais possível perdas indesejáveis e aumentar as taxas de recuperação. Recomenda-se a redução ao máximo do contacto com a luz e o ar para se evitarem perdas.

Todos estes factores fazem com que a determinação destes compostos seja, muitas vezes, apenas qualitativa. A análise, propriamente dita, de PAH's envolve geralmente as seguintes etapas: extracção, purificação ou limpeza, separação cromatográfica, detecção e quantificação cromatográfica.

2.5.2. Extracção e purificação

Dois factores tornam particularmente difícil e complexa a determinação analítica de PAH's nos alimentos, em particular nos óleos vegetais: as concentrações extremamente baixas em que normalmente se encontram - ao nível dos 0,1 µg/kg - e o facto de se encontrarem juntamente com outros tipos de matéria orgânica - como os lípidos - que se dissolvem nos mesmos solventes e que devem ser extraídos, o mais selectivamente possível, e eliminados para uma melhor detecção e identificação dos equipamentos. Para além de que, como vimos anteriormente, a extracção dos PAH's deve ser realizada o mais rapidamente possível de forma a diminuir os efeitos de degradação e de adsorção, que contribuem bastante para as perdas de PAH's da amostra.

Esta conjuntura torna necessária uma etapa de extracção muito rigorosa, de modo a isolar os analitos da matriz, remover as interferências e melhorar a sensibilidade do método. Sendo o objectivo deste estudo, a implementação de um método para a detecção e quantificação de apenas 4 PAH's – benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno e benzo[a]pireno – a extracção é somente feita numa etapa. Caso contrário – caso da norma ISO 15753:2006 [27], seriam necessárias várias etapas de extracção e purificação muito complexas para a identificação do maior número possível de compostos presentes na amostra estudada – 16 PAH's.

Contudo, qualquer etapa de extracção pode acarretar, riscos e erros adicionais. Neste sentido, é comum a utilização de padrões internos para monitorizarem eventuais perdas de analitos durante a purificação e, caso necessário, corrigi-las. O composto escolhido varia, sendo exemplos o benzo[b]criseno (utilizado neste trabalho), o perileno, o 3-metilcolantreno, o 3,6-dimetilfenantreno e os PAH's deuterados. Mais recentemente, têm sido desenvolvidos os PAH's monofluoretados que têm como vantagens terem propriedades físico-químicas e perfis de eluição muito similares aos PAH's, não ocorrerem naturalmente na natureza e serem menos dispendiosos que os PAH's deuterados.

2.5.2.1. Extracção por solventes

Existe uma vasta gama de métodos de extracção e purificação de PAH's em alimentos. Resumidamente pode recorrer-se a métodos que envolvam solventes ou métodos por adsorção em fase sólida.

No primeiro caso tem-se a extracção por Soxhlet ou por partilha de solventes - extracção líquido-líquido. Este é o processo tradicional de extracção dos PAH's, requer um solvente orgânico imiscível, de elevado grau de pureza e com boas propriedades de solubilidade relativamente aos PAH's. Por outro lado, as técnicas de extracção em fase sólida incluem a extracção com carvão, com resinas macrorreticulares - Tenax, Xad, Poliuretano -, com adsorventes - gel de sílica, Alumina, Florisil -, extracção por fluidos supercríticos e por fases ligadas, muito empregues em HPLC, constituídas por sílica porosa ligada a grupos octadecilo (C18).

Qualquer que seja o método utilizado, a propriedade mais importante a ter em conta no processo de extracção de um grupo de substâncias de uma matriz relativamente complexa, é a sua solubilidade, que no caso dos PAH's depende de três características estruturais: tamanho molecular, topologia e grau de planaridade [12].

Regra geral, os PAH's são solúveis em solventes orgânicos, contudo as suas solubilidades diferem entre eles e a escolha do solvente mais apropriado deve ter em conta não só, a sua capacidade de extracção, como também a sua temperatura de ebulição, quanto mais baixa for mais fácil será a sua posterior remoção. Um exemplo de um solvente com estas características é o diclorometano, no entanto, na maioria dos exemplos a escolha recai no hexano, ciclo-hexano ou pentano e a razão da escolha não é referida [12].

A extracção de PAH's de óleos vegetais torna-se mais complicada do que noutras matrizes, como por exemplo, na água, onde a mistura desta com um solvente orgânico permite a rápida extracção dos hidrocarbonetos. A extracção de PAH's em materiais lipídicos, como é o caso do óleo, implica que os lípidos sejam destruídos de forma a isolar os PAH's da matriz.

Normalmente, os três procedimentos mais utilizados na extracção por solventes de PAH's de óleos vegetais são a partição líquido-líquido, a complexação com cafeína e a saponificação.

Tabela 9 – Características dos procedimentos tradicionais na extracção por solventes de PAH's de óleos vegetais

Procedimentos	Descrição
Partição líquido-líquido	<ul style="list-style-type: none"> A amostra de óleo é dissolvida num solvente orgânico, caso do ciclo-hexano e os PAH's são extraídos com uma solução de dimetilformamida (DMF) - água (9:1) ou sulfóxido de dimetilo (DMSO), enquanto a maioria da matéria lipídica (constituída principalmente por triglicéridos) permanece na fase orgânica. O isolamento é levado a cabo por diluição com água, de forma a alterar os coeficientes de partição dos PAH's entre as duas fases, e nova partição com ciclo-hexano, que é eliminado mais facilmente (a temperaturas mais baixas).
Complexação com cafeína	<ul style="list-style-type: none"> Trata-se de um procedimento analítico relativamente rápido para a determinação de PAH's em óleos e gorduras. A amostra é dissolvida em ciclo-hexano e os PAH's são selectivamente extraídos por meio de agitação vigorosa numa solução de cafeína-ácido fórmico. Após decomposição do complexo, com uma solução aquosa de cloreto de sódio (2%), os PAH's são re-extraídos com ciclo-hexano, separados por cromatografia em coluna e cromatografia em camada fina (TLC), respectivamente, e determinados por cromatografia gasosa (GC).
Saponificação	<ul style="list-style-type: none"> Para o isolamento quantitativo dos PAH's em gorduras insolúveis e alimentos ricos em proteínas (como carne, peixe e queijo) é necessária a saponificação alcalina da amostra, de forma a eliminar a gordura e libertar os PAH's antes da extracção, aumentando o rendimento desta. Os extractos obtidos desta forma contêm inevitavelmente quantidades substanciais de materiais interferentes, pelo que há necessidade de se proceder à sua purificação, por intermédio de partição de solventes. O óleo é saponificado sob refluxo durante pelo menos 40 minutos com uma solução alcoólica de hidróxido de potássio e a matéria insaponificável é extraída com ciclohexano.

Comparando os três procedimentos extractivos acima descritos, a partição líquido-líquido, revela-se o melhor método, no entanto a conjugação da partição líquido-líquido com a extracção em fase sólida revela-se o método com maior poder de purificação. Em relação aos extractos obtidos de qualquer um dos procedimentos acima descritos, todos eles contêm, inevitavelmente, quantidades significativas de compostos, que não PAH's, que podem interferir com as determinações analíticas posteriores. Estes

compostos, na sua maioria, influenciam mais os limites de detecção do que a própria sensibilidade do detector.

De forma a aliviar esta ocorrência, são normalmente aplicados diferentes processos de purificação, como TLC e cromatografia em coluna com diferentes materiais adsorventes, dependendo a escolha do procedimento do grau de pureza e a selectividade desejados. A maioria destes procedimentos assenta em etapas com colunas de diferentes materiais como gel de sílica, alumina, Florisil, Sephadex LH-20, entre outros. Entre estas, as colunas de gel de sílica isoladamente ou em combinação com outros materiais, principalmente Sephadex LH-20, são vastamente usadas. No entanto, a preparação destas colunas é muito morosa, requer grande quantidade de solventes e nem sempre são obtidos resultados reprodutíveis. Anteriormente à implementação do presente método, para determinação dos 4PAH's, era utilizado um método para a determinação apenas do composto benzo[a]pireno, este método consistia numa etapa de extracção com cromatografia em coluna de alumina. Entre a mudança dos métodos não se pôs se quer a hipótese de manter um método idêntico pois era objectivo essencial neste trabalho conseguir um método rápido e eficaz.

2.5.2.2. Extracção em fase sólida

Devido à complexidade e muitas vezes falta de eficiência da extracção por solventes, o recurso à extracção em fase sólida (SPE) é cada vez mais comum, como técnica de extracção e purificação de amostras. Nesta técnica intervêm duas fases mutuamente imiscíveis, uma fase sólida – enchimento - e outra fase líquida - eluente.

A SPE é uma técnica de extracção simples, eficiente e económica, permite boas recuperações, reprodutibilidade de resultados, boas separações de componentes interferentes num tempo de análise relativamente baixo e ainda permite automação. As suas maiores desvantagens são o risco de sobrecarga do enchimento por lixiviação de amostras desconhecidas com elevado conteúdo de contaminantes, a possível perda de analitos quando se utilizam sistemas pouco conhecidos e ainda o facto de ser uma técnica dispendiosa.

Existe uma enorme variedade de enchimentos disponíveis, com vários graus de selectividade, sendo os mais utilizados para a extracção dos PAH's, a sílica e a sílica quimicamente ligada a C8, C18, CN e NH₂. Estudos mostram que as colunas de sílica apresentavam capacidade semelhante de purificação aos cartuchos de SPE, embora, em muitos casos, os últimos apresentem melhores recuperações e coeficientes de variância.

A extracção em fase sólida tem de facto representado um grande avanço sobre a extracção líquido-líquido que tem vindo progressivamente a ser substituída. As vantagens desta técnica relativamente à

extracção líquido-líquido, são muitas: utilização de menor volume de solventes tóxicos, redução do tempo de análise, maior automatização, maior selectividade e reprodutibilidade na extracção.

Apesar desta técnica se mostrar mais eficiente, não deixa de ser necessário ter em conta alguns factores de forma a optimizar as recuperações do maior número de PAH's na amostra, como o acondicionamento do cartucho, a velocidade de passagem da amostra, a secagem do cartucho após a passagem da amostra e os solventes de eluição utilizados.

A extracção em fase sólida (com discos de extracção ou com colunas de extracção) consiste na adsorção selectiva dos analitos a extrair numa fase estacionária sólida, denominada adsorvente. A fase aquosa (ou outra amostra líquida) é filtrada sob vácuo, através do disco ou coluna de extracção. Os analitos são retidos pelo adsorvente e posteriormente eluídos com um volume reduzido de um solvente orgânico adequado. O extracto é finalmente concentrado até um volume adequado à sua análise.

Genericamente, a SPE é um processo de retenção dos analitos de interesse de uma amostra sobre um suporte sólido, designado por enchimento e posterior eluição através da passagem de um líquido eluente, através do mesmo. A retenção dos diversos analitos depende da afinidade que cada um apresenta para a fase estacionária [28].

Existem diversas fases estacionárias (sílica, alumina, florisil, carbono e resinas) cuja selecção depende da natureza dos analitos a analisar e às quais correspondem diferentes tipos de interacção analito-fase estacionária [30].

- a) **Fase Reversa** envolve interacções de analitos presentes em matrizes polares com uma fase estacionária apolar. Como exemplos tem-se as fases constituídas por cadeias C8 e C18 ligadas a grupos silanol de sílica.
- b) **Fase Normal** envolve interacções entre uma fase estacionária polar e analitos presentes em matrizes apolares. Os exemplos de fases polares são a sílica, a alumina ou a sílica funcionalizada com grupos polares tais como, CN, NH₂ ou diol.
- c) **Permuta Iónica** envolve interacções iónicas entre a fase estacionária (positiva ou negativa) e os solutos carregados. Uma diversidade de resinas aniónicas ou catiónicas podem ser usadas neste tipo de interacções.
- d) **Absorção** envolve interacções entre analitos e materiais não modificados, ficando os compostos de interesse retidos no adsorvente, geralmente um material poroso.

A secagem do cartucho por vazio após a passagem da amostra melhora as recuperações de todos os PAH's, no entanto não deve ser muito prolongada - alguns minutos parecem suficientes, pois pode haver perdas dos compostos voláteis. Entre os possíveis eluentes utilizados para a remoção dos PAH's dos cartuchos, o diclorometano e o tetrahidrofurano apresentaram melhores recuperações que, por exemplo o acetonitrilo ou o hexano regularmente utilizados.

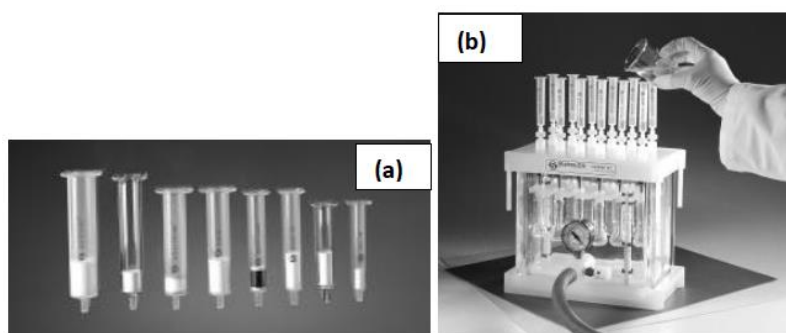


Figura 7 - Colunas de extracção em fase sólida (a) e sistema de filtração sob vácuo (b) [28,29]

O procedimento de SPE inicia-se pelo condicionamento da fase estacionária seguindo-se a filtração da amostra; poderá incluir-se um passo de lavagem da coluna de extracção com um solvente fraco, para remover impurezas, ou um passo de secagem da coluna em corrente de azoto, para remover água; por fim efectua-se a eluição dos analitos com um solvente ou solventes adequados (Figura 8).

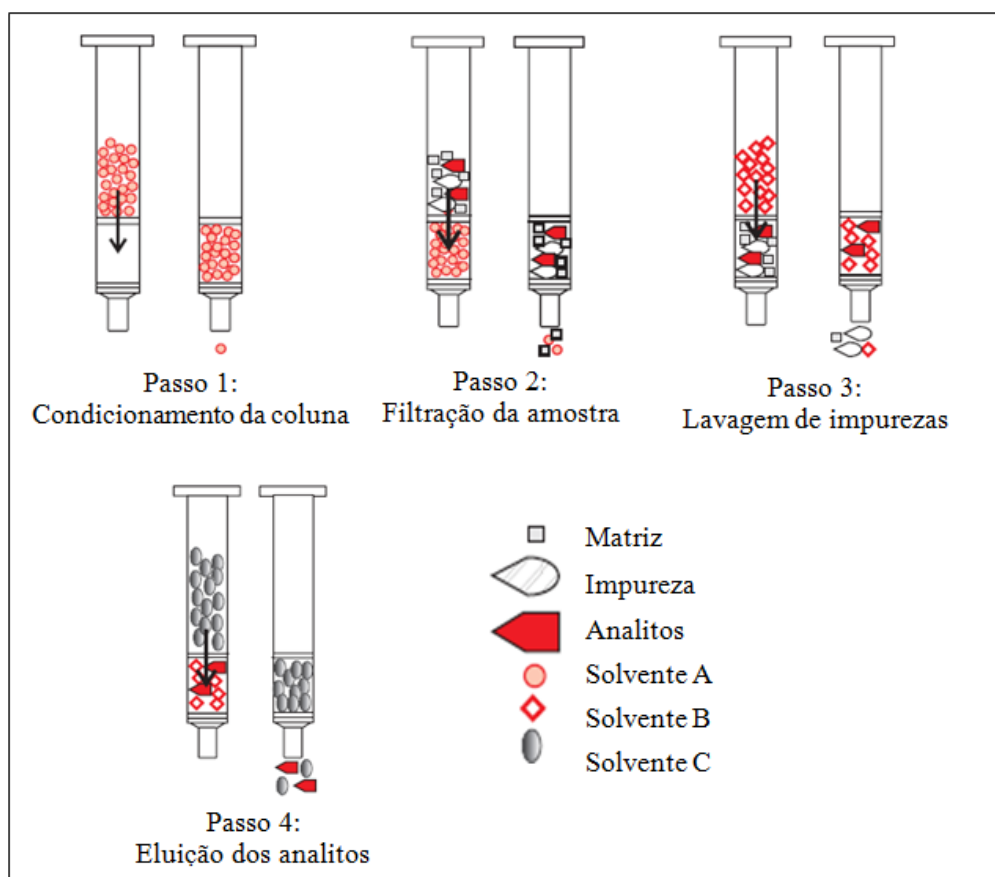


Figura 8 - Etapas do processo de extração em fase sólida (Adaptado da Ref^a [27])

Em alternativa aos métodos tradicionais de preparação de amostras, existem ainda outras técnicas empregues para este objectivo, como a utilização de membranas semi-permeáveis para o isolamento quantitativo de PAH's de amostras lipídicas onde o teor lipídico pode ser reduzido em 90 a 99%, dependendo do tipo e quantidade de lípidos, ou ainda a extracção com fluídos supercríticos (SFE), a cromatografia de permeação em gel (GPC) e preparação da amostra por *donor acceptor complex chromatography* (DACC).

A SFE é um processo extractivo onde os solventes habitualmente utilizados são substituídos por um fluido supercrítico, que na maioria das vezes é o dióxido de carbono. No entanto, este solubiliza não apenas os contaminantes, mas também os lípidos, pelo que se exige uma limpeza do extracto antes da determinação [12]. Para contornar este obstáculo, desenvolveu-se um método SFE que permite a extracção selectiva de PAH's em matrizes biológicas ricas em lípidos, sem a necessidade de uma limpeza suplementar. Este método baseia-se na adição de esferas absorptivas C18 à amostra inicial, que é colocada na câmara de SFE. Durante a SFE, os lípidos são preferencialmente retidos naquelas esferas C18, e os PAH's extraídos selectivamente com CO₂ supercrítico. Esta técnica apresentava recuperações dos PAH's na ordem dos 94% a 100%.

Hoje em dia, as técnicas de extracção por fluido supercrítico são também bastante utilizadas pois trazem grandes vantagens relativamente a outras: são menos demoradas, utilizam menores quantidades de solventes tóxicos, são menos dispendiosas, possibilitam extracções e limpezas selectivas e exigem menores volumes de amostra.

Outra técnica empregue para a preparação da amostra é, como já foi referido, por *donor acceptor complex chromatography* (DACC) com uma sílica modificada (tetracloroftalimidopropilo). Esta técnica baseia-se na formação de complexos moleculares, por interacções fracas (forças de dispersão e dipolo-dipolo), entre os PAH's (dadores de electrões) e a fase aceitadora, que aumentam de força com o aumento do número de anéis aromáticos. Isto resulta na retenção dos PAH's e na eluição da grande maioria dos outros componentes do óleo. Após purificação nesta coluna, os PAH's são transferidos e separados numa coluna analítica de HPLC. Relativamente aos métodos tradicionais, esta técnica poupa bastante tempo e reduz significativamente o desperdício de solvente.

Por último, existe ainda outra técnica aplicável para a purificação de PAH's é a cromatografia de permeação em gel (GPC). Esta técnica separa as substâncias pelo tamanho molecular. São usados grandes volumes de solventes durante a preparação da amostra, pelo que, é necessário concentrar o extracto final para um volume muito pequeno. As amostras parcialmente purificadas são subsequentemente sujeitas a concentração antes da determinação cromatográfica. Neste processo, é crítico concentrar a solução (remover o solvente) cuidadosamente de forma a não secar completamente o extracto, caso contrário os PAH's de tamanho molecular mais reduzido, extremamente voláteis, são facilmente evaporados, diminuindo as recuperações alcançadas. Este facto leva a que nalguns procedimentos, estes compostos não possam ser quantificados, procedendo-se apenas a uma avaliação qualitativa.

2.5.3. Separação cromatográfica

A mistura de PAH's extraída e isolada dos alimentos é constituída por variados compostos individuais tornando-se assim bastante complexa, pelo que se exigem não só métodos eficientes de separação, com a maior capacidade de resolução possível, como também métodos de detecção específicos.

É conhecida uma vasta gama de técnicas analíticas descritas para a separação e detecção destes compostos em diferentes géneros alimentícios: TLC, cromatografia com fluidos supercríticos (SFC), electroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC). Entre estes, os mais frequentemente aplicados na análise quantitativa de PAH's em óleos vegetais são TLC, HPLC e GC.

Na escolha do método analítico adequado para a quantificação destes compostos, deve-se ter em conta a natureza e os níveis de concentração em que normalmente se encontram na amostra [6]. Quando

predominam PAH's não substituídos, como o caso deste trabalho, a técnica de eleição é HPLC. O único requisito necessário para os PAH's serem analisados por HPLC é a sua solubilidade nos solventes utilizados para cada método [23]. As vantagens de utilizar a HPLC, relativamente a outros, na análise de PAH's, é o grande poder resolutivo, concedido pela utilização de uma grande variedade de fases estacionárias capazes de permitirem uma boa selectividade, o curto tempo de análise, a possibilidade de análise de substâncias termolábeis e a capacidade para utilizar directamente certas propriedades moleculares dos compostos como a absorção no ultravioleta (UV) e a fluorescência [15].

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), técnica utilizada neste trabalho, também pode ser usada com igual facilidade com estas substâncias, pelo que a cromatografia líquida em fase reversa é uma das técnicas separativas mais frequentemente utilizadas para análise de PAH's. Nesta técnica, a fase móvel é mais polar que a estacionária e, de uma forma geral, o tempo de retenção é menor para os compostos que têm maior polaridade ou menor número de anéis aromáticos. Os materiais de enchimento são constituídos por hidrocarbonetos com diversos comprimentos de cadeia (C2, C8 ou C18), quimicamente ligados a partículas de sílica; as colunas de octadecilo (C18) são as mais utilizadas para a separação de PAH's devido à sua alta eficiência de resolução. O modo como estas fases C18 são preparadas é um factor bastante importante a ter em consideração, pois dos 4 PAH's quantificados existem alguns que têm tempos de retenção muito próximos, nomeadamente, o benzo[a]antraceno e o criseno, que não podem ser separados convenientemente em colunas monoméricas, pelo que alguns fabricantes (Supelco e Vydac, por exemplo) fabricam enchimentos poliméricos de C18 específicos para a análise de PAH's.

A fase móvel utilizada em HPLC é normalmente uma mistura de água com vários solventes orgânicos, principalmente metanol e acetonitrilo, estabelecendo-se frequentemente um gradiente, o solvente orgânico utilizado neste trabalho é o acetonitrilo. Aumentando a proporção de solvente orgânico na fase móvel, diminui o tempo de retenção dos compostos menos polares. Usando uma coluna de fase reversa obtêm-se uma relação entre o número de carbonos e os tempos de retenção no cromatograma, pelo que permite a estimativa dos tamanhos moleculares de cada um dos compostos.

A eficiência de resolução obtida por HPLC/UPLC comparada com TLC é bastante superior, no entanto, para os PAH's de baixa massa molecular não se aproxima à resolução oferecida por GC. Contudo, usando colunas de fase reversa, a técnica de HPLC permite uma rápida e boa selectividade na separação de um número de isómeros difíceis de separar por GC. Esta discriminação é importante na medida em que as propriedades carcinogénicas e mutagénicas diferem significativamente entre isómeros. Outra vantagem da HPLC relativamente à GC é que esta é levada a cabo à temperatura ambiente, permitindo assim a detecção de PAH's de elevada massa molecular que não podem ser detectados por GC, devido à decomposição térmica destes a altas temperaturas, ou por TLC, devido à vaporização.

Existe ainda, um método alternativo de separação de PAH's em óleos vegetais por HPLC, o qual consiste na injeção directa do óleo na coluna cromatográfica, evitando todo o procedimento extractivo, e as perdas subjacentes a este durante a concentração da amostra, poupando tempo e solventes. Envolve apenas uma fase estacionária aceitadora de electrões (sílica modificada com tetracloroftalimidopropilo) e, como fases móveis, misturas de solventes orgânicos: hexano/diclorometano, tetrahydrofurano, entre outros, que são bons solventes de PAH's, ao contrário dos habitualmente utilizados (acetonitrilo/água ou metanol/água) [31].

Por último, outro método bastante utilizado na separação destes compostos é a GC capilar. A característica fundamental para um composto ser analisado por GC é a sua volatilidade dentro do intervalo de temperaturas usado, pelo que PAH's contendo até 24 carbonos podem ser analisados por GC. As maiores vantagens da GC em relação a outras técnicas são a rapidez, o seu poder resolutivo e a capacidade de detectar concentrações muito baixas (sensibilidade).

Quando é desejável analisar um grande número de PAH's é usual utilizar a GC capilar, enquanto que a HPLC é escolhida para a determinação individual de um número pequeno de isómeros de PAH's. Mesmo apesar da desvantagem, no que respeita à resolução cromatográfica, que pode ser compensada pelo uso de detectores sensíveis e específicos (fluorescência), a cromatografia líquida de alta eficiência permite a separação de isómeros com relativa facilidade ao contrário da cromatografia gasosa.

Para além destas ainda têm sido desenvolvidas um grande número de técnicas para a determinação de PAH's em óleos vegetais envolvendo espectrometria de massa, nomeadamente: LC-GC/MS e LC-LC-GC. Estes sistemas tornam-se adequados para a análise de PAH's apresentando imensas vantagens relativamente a outros: evitam de forma considerável a perda de analitos, reduzem drasticamente o tempo de análise, o volume de solventes necessários e o manuseamento das amostras. A sensibilidade é ainda aumentada, pois toda a fracção é transferida para a coluna, o sistema pode ser automatizado para análises de rotina e possibilitam ainda a análise seriada de amostras.

2.5.4. Detecção cromatográfica

A detecção e identificação dos picos cromatográficos dos PAH's é feita através dos seus espectros de absorção no UV e fluorescência. A detecção destes compostos na gama ultravioleta (254 nm) é muito usual, no entanto, e na medida em que, a maioria dos PAH's têm fortes características fluorescentes intrínsecas, a utilização de um detector espectrofluorimétrico permite, através da optimização de comprimentos de onda de excitação e de emissão, torná-la numa técnica bastante forte no que respeita à sensibilidade e selectividade, apenas comparável à obtida com GC/MS. Um detector de fluorescência é cerca de 1000 vezes mais sensível que os de UV. As quantidades mínimas detectáveis

de PAH's individuais, determinadas por HPLC-fluorescência, podem ser tão baixas como 0,8 pg com limites de quantificação no intervalo 0,02 µg/mL a 3 µg/mL.

Cada PAH tem um espectro de excitação e de emissão por fluorescência característico, encontram-se descritos na literatura exemplos de comprimentos de onda referenciados para a detecção fluorimétrica de PAH's, um par universal típico é 290 nm/430 nm. No entanto, a detecção por fluorescência também tem limitações. Por exemplo, acontece com frequência ter substâncias interferentes nas amostras com emissão no mesmo intervalo de comprimentos de onda do analito de interesse. No sentido de ultrapassar este eventual acontecimento, pode tornar-se a detecção selectiva estabelecendo comprimentos de onda de excitação e emissão específicos para os PAH's. Isto faz com que os cromatogramas de misturas complexas de PAH's se tornem mais simplificados, facilitando a sua identificação e ajudando a estabelecer a pureza do pico cromatográfico.

Um dos métodos mais eficientes para a separação e identificação de PAH's presentes numa mistura é através da separação por GC efectuada com a ajuda da detecção por espectrometria de massa (MS) através dos seus índices de retenção, esta associação representa uma combinação poderosa para análise de PAH's, e tem sido sugerida ao longo do tempo como o método mais fidedigno [24].

A técnica TLC tem a grande vantagem de permitir que os componentes separados possam ser recuperados para análise posterior. É uma técnica simples e rápida, no entanto, a oxidação destes compostos pode levantar problemas [9]. A LC em fase reversa com detecção UV é muito selectiva, mas não tem o poder resolutivo oferecido pela GC, no entanto, se for acoplado um detector de fluorescência, a técnica torna-se muito mais sensível, em particular para os PAH's de peso molecular elevado.

Com o objectivo de desenvolver estudos de referência para a avaliação dos procedimentos de quantificação de PAH's nos alimentos, o *Community Bureau of Reference of the Comission of the European Communities* organizou um estudo interlaboratorial de comparação de métodos para a determinação e identificação destes compostos. O programa comparativo foi desenvolvido em 14 laboratórios europeus, tendo utilizado, como amostra, óleo de coco contaminado com uma mistura de PAH's (pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e benzo[g,h,i]perileno).

Os métodos usados pelos laboratórios nos processos de extracção e limpeza foram diversos, assim como os solventes utilizados. As técnicas utilizadas foram GC-FID, GC/MS e HPLC com detecção por fluorescência e/ou UV. Alguns laboratórios usaram TLC, mas a precisão e reprodutibilidade foram muito baixas.

Numa primeira abordagem à análise dos resultados, observou-se uma inconsistência entre os diversos laboratórios intervenientes, revelando uma reduzida precisão e exactidão e sugerindo a necessidade de estudar os diferentes passos dos procedimentos de forma a obter melhorias. No decorrer do estudo foi se observando uma melhoria considerável nos resultados, nomeadamente ao nível da exactidão e precisão dos procedimentos analíticos usados. No entanto, e pela leitura atenta dos resultados, foi possível realçar consideráveis diferenças entre laboratórios que usavam métodos muito similares. Não sendo possível observar qualquer evidência de uma sobreposição clara de resultados em qualquer técnica analítica em estudo nem em HPLC nem em GC.

Este tipo de estudos é fundamental de forma a melhorar a qualidade das determinações analíticas de PAH's em alimentos, possibilitando, através da comparação de resultados, a identificação e posterior correcção dos principais factores de erro.

Tabela 10 - Vantagens e desvantagens de métodos de análise de PAH's em óleos vegetais

Extracção e Purificação	
Extracção por solventes	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicas muito complexas; • Pouco eficientes; • Pouca automatização; • Longo tempo de análise;
Extracção em fase sólida (SPE)	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica simples, eficiente e económica • Boas recuperações; • Boa reprodutibilidade de resultados e boas separações de componentes interferentes; • Possibilidade de automatização; • Curto tempo de análise;
Extracção por fluidos super críticos (SFE)	<ul style="list-style-type: none"> • Curto tempo de análise; • Reduzida quantidade de solventes tóxicos; • Pouco dispendiosa; • Exige menos volume de amostra;
Cromatografia de permeação em gel (GPC)	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil de concentrar a solução de forma a não secar completamente o extracto o que pode diminuir as recuperações alcançadas;
Preparação da amostra por <i>donor acceptor complex chromatography</i> (DACC)	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de análise bastante curto comparativamente a outras técnicas; • Reduz significativamente o desperdício de solvente;
Separação	
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de eleição quando predominam PAH's não substituídos; • Grande poder resolutivo; • Boa selectividade; • Curto tempo de análise; • Levada a cabo a temperatura ambiente; • Determinação individual de um número pequeno de isómeros de PAH's
Cromatografia coluna fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzida resolução relativamente a HPLC;
Cromatografia gasosa (GC)	<ul style="list-style-type: none"> • Grande poder resolutivo; • Alta sensibilidade (capacidade de detectar concentrações muito baixas); • Pode levar a decomposição térmica (atinge altas temperaturas); • Componentes têm de ser voláteis.
Cromatografia gasosa capilar	<ul style="list-style-type: none"> • Determinação de grande número de PAH's;

Tabela 11 - Vantagens e desvantagens de métodos de análise de PAH's em óleos vegetais (continuação)

Separação e identificação	
Detector de fluorescência (FLD)	<ul style="list-style-type: none"> • Cerca de 1000 vezes mais sensível que UV; • Aparecimento de substâncias interferentes com emissão no mesmo intervalo de comprimentos de onda do analito de interesse;
Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia em massa (GC/MS)	<ul style="list-style-type: none"> • Grande eficiência; • Combinação poderosa para a análise de PAH's:
HPLC – UV	<ul style="list-style-type: none"> • Grande selectividade; • Baixa sensibilidade;
HPLC – Fluorescência	<ul style="list-style-type: none"> • Grande selectividade; • Boa sensibilidade;

3. Descrição do processo experimental

3.1. Objectivos

Como foi realçado na parte teórica deste trabalho, a exposição a PAH's constitui um problema de saúde pública pelo carácter tóxico, e em particular carcinogénico, destas substâncias. Assim, é de extrema importância a avaliação da exposição humana a PAH's, com o objectivo de estimar o risco decorrente.

Este trabalho foi desenvolvido, tendo por base as alterações na legislação publicadas pelo Regulamento (UE) n° 835/2011 da Comissão de 19 de Agosto de 2011, no que diz respeito aos valores dos teores máximos de PAH's [3].

Neste contexto, a presente dissertação teve como principais objectivos a implementação e validação de um método analítico para a quantificação de 4 PAH's – Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)pireno e Criseno - em amostras de óleos vegetais de soja e girassol, bem como o estudo da evolução do teor destes compostos ao longo do processo de produção destes géneros alimentícios. O interesse da monitorização dos valores de PAH's durante o processamento industrial deve-se ao facto de algumas etapas da refinação serem responsáveis pela diminuição dos seus teores e justificarem, deste modo, os níveis geralmente baixos encontrados nos óleos disponíveis comercialmente.

Durante o decurso dos trabalhos experimentais, existiu a oportunidade de comparar os resultados obtidos com resultados de laboratórios externos acreditados permitindo assim uma comparação interlaboratorial, que se traduziu num melhor estudo da aplicabilidade e precisão dos resultados da metodologia analítica de determinação de PAH's em óleos e gorduras vegetais e animais (ISO 15753:2006), que se encontrava em fase de implementação. Esta comparação interlaboratorial contribuiu bastante para a melhoria do método, na medida em que foram alteradas não só as condições cromatográficas iniciais da técnica como também o procedimento de purificação da amostra. Posteriormente foram estudados os parâmetros essenciais à sua validação.

3.2. Amostras

No decorrer deste estudo foram avaliados os teores de PAH's em óleos vegetais crus e refinados provenientes de diversas origens.

Todas as amostras dos óleos estavam contidas em embalagens adequadas (garrafas de vidro) perfeitamente seladas e acondicionadas.

Uma vez no laboratório, todas as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente num local ao abrigo da luz até ao momento da análise, de forma a minimizar a ocorrência de foto degradação dos compostos em estudo. Durante a preparação das amostras foram tomadas as medidas entendidas como necessárias para reduzir o risco de contaminações indesejáveis com possível influência na detecção final.

Cada uma das amostras dos diversos óleos vegetais sujeitos a análise foi extraída e purificada em duplicado. Desta forma, os resultados apresentados correspondem à média de duas injeções. Não surgiu necessidade de mais repetições pois os resultados obtidos foram bastante idênticos, para além disso a utilização de mais um cartucho SPE em cada análise tornava-se muito dispendiosa tendo em consideração a quantidade de amostras.

3.3. Método Experimental

Para a implementação do método em estudo recorreu-se à extracção em fase sólida (SPE) para a extracção e purificação da amostra. Este processo foi realizado em cartuchos SupelMIP™ SPE-PAH's destinados à extracção de analitos específicos em matrizes complexas, como é o caso dos óleos vegetais. A separação cromatográfica foi realizada num equipamento HPLC com coluna fase reversa com detector de fluorescência.

3.3.1. Materiais e equipamento

No método analítico que se apresenta utiliza-se, entre outro, o seguinte material:

- Seringa de 2 mL, Terumo
- Balão de fundo plano de 10 mL
- Vials de 10 mL
- Filtros de seringa de 4 mm de diâmetro e 0,2µL de poro, membrana Nylon, PP, Whatman
- Mini vials transparentes 12x32mm, 2 mL com cápsulas de alumínio 11 mm e septo de silicone
- Capsulador manual 11mm, Agilent
- Pipetas de vidro 1 e 3 mL
- Pompete de borracha

Todo o material de vidro utilizado nas diversas etapas é sujeito a um procedimento de limpeza que engloba uma lavagem prévia com água e detergente adequado e nova lavagem com *n*-heptano sendo posteriormente seco em estufa a 60°C.

O equipamento usado para a quantificação dos PAH's em óleos vegetais é:

- Equipamento de HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) , Perkin Elmer Series 200

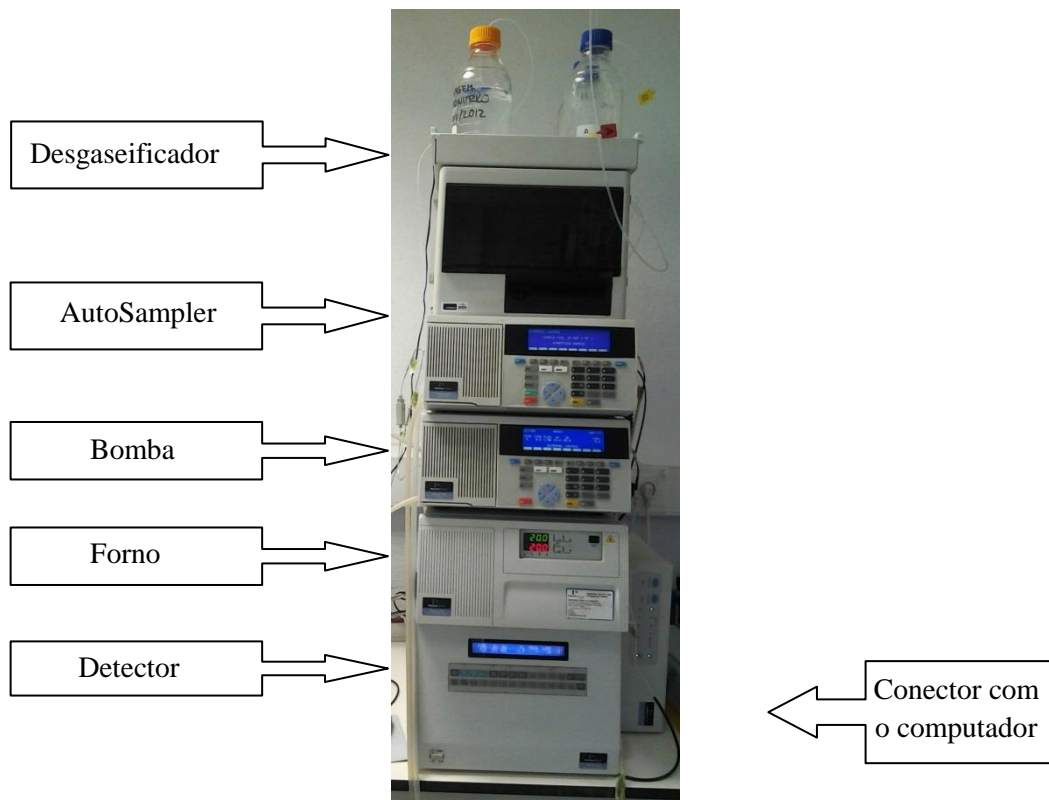


Figura 9 – Equipamento HPLC

O equipamento utilizado para o doseamento dos PAH's é equipado com uma bomba, um degaseificador, um forno, um detector e um injetor automático com *loop* de 20 uL.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica (5 um, 25 cm x 4,6 mm) fase reversa C18 da Grace Vydac para a separação dos analitos, sendo que foi termostatada a 20,0 °C.



Figura 10 - Coluna Cromatográfica fase reversa C18

O sistema de detecção usado foi um detector de fluorescência com uma lâmpada Xenon 150W. A recolha e tratamento dos dados foram efectuados pelo programa informático TotalChrom v6.2.0.0.1.

- Balança analítica, Mettler



Figura 11 - Balança analítica

Todas as determinações de massa foram realizadas numa balança analítica modelo Toledo AB204 – S/FACT.

- Cartuchos de extracção SPE SupelMIP™ SPE-PAH's, Supelco



Figura 12 – Cartucho SupelMIP™ SPE-PAH's (referência 52773-U) 50 mg

Foram utilizados cartuchos de extracção SupelMIP™ SPE-PAH's (referência 52773-U) 50 mg.

- Corrente de azoto, Air Liquide



Figura 13 – Corrente de Azoto Air Liquide

A corrente de azoto serviu para purgar a preparação, de forma a evaporar o solvente e a concentrar os componentes de PAH's presentes na amostra.

3.3.2. Solventes e Reagentes

No método analítico utilizam-se os seguintes solventes e reagentes:

- Acetato de etilo para cromatografia, Fisher, CAS N° 141-78-6
- Acetonitrilo para cromatografia, Fisher, CAS N° 75-05-8
- Água bidestilada para cromatografia, Fisher, CAS N° 7732-18-5
- Ciclo-hexano para cromatografia, Fisher, CAS N° 110-82-7
- Tetra-hidrofurano para cromatografia, Fisher, CAS N° 109-99-9
- *n*- Heptano para cromatografia, Panreac, CAS N° 142-82-5
- Azoto industrial, Air Liquide ®

Sendo este um método extremamente rigoroso, todos os solventes orgânicos utilizados tinham grau de pureza para HPLC.

Tanto a água como o acetonitrilo utilizados na preparação dos efluentes para análise cromatográfica foram filtrados a vácuo antes de serem utilizados.

3.3.3. Preparação de Soluções

3.3.3.1. Preparação de soluções de reagentes

No decorrer do procedimento experimental deste trabalho é necessária apenas uma solução para além das soluções padrão utilizadas.

A solução é uma mistura de Acetonitrilo: Tetra-hidrofurano 90:10 (v/v). A preparação desta solução consiste apenas em medir nas proporções certas cada uma das respectivas soluções:

- Acetonitrilo para cromatografia, Fisher , CAS Nº 75-05-8
- Tetra-hidrofurano para cromatografia, Fisher, CAS Nº 109-99-9

3.3.3.2. Preparação de soluções-padrão

No estudo que se apresenta empregaram-se cinco padrões:

- Solução Padrão Benzo[a]antraceno 10 µg/mL em acetonitrilo, Dr. Ehrenstorfer
- Padrão Criseno 100 mg, Fluka
- Solução Padrão Benzo[b]fluoroanteno 10 µg/mL em acetonitrilo, Dr. Ehrenstorfer
- Solução Padrão Benzo[a]pireno 10 µg/mL em acetonitrilo, Dr. Ehrenstorfer
- Solução Padrão Benzo[b]criseno 10 µg/mL em acetonitrilo, Dr. Ehrenstorfer

Apesar de serem apenas 4 os PAH's estudados neste trabalho, optou-se por utilizar uma solução padrão interna - Benzo[b]criseno, para garantir que não havia perda de PAH's durante a extracção e preparação da amostra, sugerindo assim uma boa recuperação.

As soluções padrão foram conservadas à temperatura ambiente, acondicionadas nas respectivas embalagens originais e no escuro de forma a evitar-se eventual foto degradação dos PAH's.

Tendo em conta as características das soluções padrão, procedeu-se a duas preparações diferentes das soluções padrão de referência utilizadas na recta de calibração. No primeiro caso, das soluções de marca Dr. Ehrenstorfer, que se encontravam diluídas em acetonitrilo, adicionaram-se 250 µL de cada uma das respectivas soluções padrão a um balão volumétrico de 25 mL de capacidade, perfazendo-se o volume total com acetonitrilo, de seguida procedeu-se a sucessivas diluições de forma a abranger uma gama de concentrações de 50 µg/kg a 0,05 µg/kg. Posteriormente, no decorrer na experiência, verificou-se que não era possível obter resultados aceitáveis para concentrações inferiores a 0,5 µg/kg, pelo que, as calibrações foram realizadas apenas na gama de concentrações dos 50 µg/kg a 0,5 µg/kg, suficiente para abranger a futura gama de trabalho.

As diluições foram realizadas segundo a fórmula:

$$c_A \times V_A = c_B \times V_B$$

onde,

c_A – Concentração da solução padrão de partida;

c_B – Concentração da solução padrão a preparar;

V_A – Volume da solução padrão de partida;

V_B – Volume final da solução.

Os cálculos efectuados encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 12 – Cálculos realizados na preparação das soluções padrão Dr. Ehrenstorfer para as rectas de calibração

Concentração da solução a preparar (ppb)	Concentração da solução Padrão de partida (ppb)	Volume da solução padrão de partida (mL)	Quantidade de solvente (mL)	Volume Total (mL)
100,00	10000,00	0,25	24,75	25,00
50,00	100,00	12,50	12,50	25,00
25,00	50,00	12,50	12,50	25,00
20,00	100,00	5,00	20,00	25,00
10,00	20,00	12,50	12,50	25,00
5,00	10,00	12,50	12,50	25,00
2,00	10,00	5,00	20,00	25,00
1,00	2,00	12,50	12,50	25,00
0,50	1,00	12,50	12,50	25,00
0,20	1,00	5,00	20,00	25,00
0,10	0,20	12,50	12,50	25,00
0,05	0,10	12,50	12,50	25,00

No segundo caso, para o Padrão Criseno, primeiramente preparou-se uma solução de 10 µg/ml, mas desta vez dissolvendo 2,5 mg de padrão em 250 ml de acetonitrilo.

Os cálculos foram realizados através da seguinte fórmula:

$$C = \frac{m}{V}$$

Onde,

C – Concentração;

m – Massa;

V – Volume.

Os cálculos efectuados encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 13 - Cálculos realizados na preparação da solução padrão da Fluka para a recta de calibração

Concentração da solução a preparar (ppm)	Concentração da solução a preparar (ppb)	Massa de Padrão (µg)	Massa de Padrão (mg)	Volume Total (mL)
10,00	10000,00	2500,00	2,50	250,00

Uma vez preparada a solução “de partida”, fez-se as respectivas diluições da mesma forma que no caso anterior, tabela 12.

As soluções padrão de referência foram utilizadas para obtenção das rectas de calibração de cada um dos compostos, dos respectivos espectros de emissão e excitação em fluorescência e a posterior determinação dos tempos de retenção.

3.3.4. Equipamento e condições de análise

Aquando a utilização do equipamento existe uma ordem para ligar e desligar o HPLC que é importante ser seguida: Bomba, detector, autosampler, forno e desgaseificador. O procedimento necessário realizar no momento da injeção das soluções previamente preparadas consiste na criação de uma sequência com a identificação de cada uma das amostras.

As condições de operação usadas para a realização da separação cromatográfica no processo analítico encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Condições operacionais do método analítico

Condições de Operação	
Fase móvel	Acetonitrilo + Água
Temperatura	20 ° C
$\lambda_{exc.}$	270 nm
$\lambda_{em.}$	446 nm
Volume de injeção	20 μ L
Tempo de análise	20 min.

A fase móvel é constituída por Acetonitrilo e água Ultra pura. Ambos os constituintes foram filtrados a vácuo antes de serem utilizados. Após estudo intensivo das condições operacionais (ver anexo 2) estabeleceu-se o gradiente e o fluxo apresentados no quadro seguinte:

Tabela 15 – Gradiente e fluxo usado no método analítico

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Água (%)	Fluxo (mL/min)
10	85	15	1,2
10	100	0	1,5

O estudo das condições operacionais tornou-se mais demorado e exaustivo na tentativa de separar dois dos analitos, B[a]A e Cri, que saíam em tempos de retenções bastante próximos. Para além disso tentou-se obter a melhor qualidade na separação dos compostos no menor tempo de análise possível. Contudo, o gradiente de análise escolhido acabou por se revelar bastante simples como se pode constatar.

Optou-se por intercalar a injeção de uma corrida denominada “método lavagem” entre cada injeção de amostras diferentes, não só para eliminar qualquer vestígio da amostra anterior na coluna como também para se iniciar a nova corrida, da nova amostra, nas condições equivalentes às condições iniciais do nosso método.

Tabela 16 - Gradiente e fluxo usado no “método lavagem”

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Água (%)	Fluxo (mL/min)
10	15	85	1,2

Os PAH's foram detectados através de fluorescência. As vantagens deste tipo de detecção já foram referidas anteriormente, destacando-se a excelente selectividade e sensibilidade. Factos comprovados mais adiante através das curvas de calibração.

3.3.4.1. Optimização das condições operacionais

A coluna cromatográfica utilizada (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm) – C18 Fase Reversa Grace Vydac, não permitiu separações satisfatórias (resolução) de alguns compostos, nomeadamente entre o benz[a]antraceno e o criseno. Para solucionar este problema, como foi dito anteriormente, testaram-se diversos gradientes com o objectivo de aumentar as diferenças entre os tempos de retenção (ver anexo 2). Um dos gradientes das fases móveis testados foi o que é mencionado na norma ISO 15753:2006 [27] que serviu de suporte a este estudo, no entanto este continuava a não permitir uma resolução eficiente dos hidrocarbonetos em estudo.

Apesar do esforço para separar estes dois compostos as melhorias observadas não foram consideradas satisfatórias, levando assim a concluir que a coluna cromatográfica em uso já não se adequava à separação eficiente dos PAH's, provavelmente devido ao desgaste de uso contínuo.

Necessidades de alteração da coluna:

- Mudança no formato dos picos (pico largo, splitting, cauda frontal, etc.);
- Mudança na eficiência da separação;
- Mudança no tempo de retenção;
- Ruído na linha de base;

Sabendo à priori que as condições da coluna cromatográfica se alteram após determinado tempo de utilização, nomeadamente, a capacidade de separação dos picos, resolveu-se proceder à limpeza da coluna de forma a restaurar a sua superfície. Esta restauração pode ser feita tratando o material com uma série de solventes específicos para limpá-la de qualquer amostra que resta e revitalizar o seu material de apoio.

O método de restauração utilizado foi a reversão de fluxo, que consiste em colocar a coluna na direcção oposta à do fluxo e fazer o solvente passar através dela. Este método ajuda a aliviar o efeito de acumulação de amostra na coluna que ocorre com o passar do tempo.

Procedimento de limpeza da coluna cromatográfica:

- 10 min 3ml/min acetonitrilo;
- 10 min 3ml/min água;

➤ 10 min 2ml/min Água: Acetonitrilo (50:50%)

Uma outra adversidade que surgiu aquando das injeções das primeiras amostras prendeu-se com a existência de substâncias interferentes com o mesmo tempo de retenção e emitindo nos mesmos comprimentos de onda de alguns dos analitos, inviabilizando a determinação precisa destes. Os PAH's mais afectados por esta interferência eram os primeiros a sair, com menor tempo de retenção, o benzo[a]antraceno e criseno.

Após várias tentativas para detectar esses interferentes, concluiu-se que os responsáveis pelo aparecimento daqueles picos era uma ineficiente concentração da amostra na etapa de secagem do solvente – que inicialmente era realizada com vácuo em banho termostatizado – levando-a, não só, que houvessem restos de solvente que não era eliminado como também ao desaparecimento quase completo dos analitos em estudo. De forma a colmatar este problema e obter melhores resultados passou-se a utilizar uma corrente de azoto de forma a evaporar o solvente. Esta mudança trouxe resultados bastante positivos, na medida que em que grande parte dos interferentes desapareceram e os que persistiram encontravam-se em tempos de retenção diferentes dos analitos em estudo.

3.3.5 Procedimento Experimental

No presente trabalho emprega-se uma extracção sólido-líquido utilizando os cartuchos: SupelMIPTM SPE-PAH's. O procedimento de extracção/purificação utilizado consistiu nos seguintes passos:

- Prepara-se o cartucho SupelMIP eluindo, por acção da gravidade, o cartucho inteiro com ciclo hexano (cerca de 3mL);
- Num balão de fundo plano de 10 mL, pesar 0,5 g de amostra + 0,5 mL de ciclo hexano (adicionar 1μL da solução 10 ppm de benzo[b]criseno) e adicionar ao cartucho.
- Lavar o balão da amostra com ciclo hexano (1mL +1mL) para arrastar os resíduos de amostra que ficaram no frasco. Adicionar novamente ao cartucho.
- Fazer a eluição, por acção da gravidade, dos PAH's com 3 ml de acetato de etilo para um vial de 10 mL.
- Evaporar até à secura o eluato de acetato de etilo obtido a partir do cartucho purgando com uma corrente de azoto.
- Dissolver o resíduo com 250 μL de uma mistura de Acetonitrilo: Tetrahydrofurano (90:10%).
- Recolher para uma seringa de 2 mL. Filtrar através de um filtro de seringa de 3 mm de diâmetro e 0,45 μL e verter completamente a mistura para um vial.
- Colocar o vial na posição indicada no autosampler do equipamento.
- No software criar uma sequência com a identificação de cada uma das amostras a injectar.

4. Resultados e discussão

4.1 Sumário do desenvolvimento do método

Tendo em consideração que o método da norma ISO 15753:2006 é um método, consideravelmente, muito demorado (aproximadamente 2 dias de análise) [27], o que para uma empresa de grandes dimensões, como a SOP, que na maioria das vezes precisa dos resultados das análises com a maior brevidade possível, tornava-se bastante desadequado, pelo que surgiu a necessidade de se adaptar a um método mais rápido. Juntando isto, ao facto de o custo da realização destas análises em laboratórios externos ser bastante avultado foi necessário procurar-se por alternativas.

A escolha do processo analítico utilizado neste trabalho justifica-se pela sua adequação à análise de PAH's nesta matriz alimentar, conforme demonstrado em capítulos anteriores.

Resumidamente, o princípio do método utilizado neste estudo consiste na extracção dos PAH's com acetato de etilo através de cartuchos SPE – PAH's, seguido de concentração com acetonitrilo: Tetrahydrofurano (90:10%). A determinação do teor dos PAH's individuais, após a separação por HPLC, fez-se por medição da fluorescência.

Devido às quantidades vestigiais em que os PAH's estão presentes nos óleos vegetais, na ordem dos 0,1 µg/kg, existe a necessidade de introduzir fases prévias rigorosas de extracção e concentração dos analitos para além da utilização de métodos de detecção muito sensíveis.

Na medida em que se alterou bastante o procedimento experimental e as condições descritas na norma ISO 15753:2006 [27] e de forma a validar o método experimental foram necessários determinar alguns dos parâmetros habitualmente utilizados na validação de metodologias analíticas, nomeadamente especificidade, calibração, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, precisão e exactidão [30, 32].

4.2. Especificidade/Selectividade

A especificidade ou selectividade (IUPAC) corresponde à capacidade de um método analítico para discriminar o analito de outras substâncias presentes na amostra. Como já foi referido anteriormente, na presente dissertação, aquando das primeiras injecções das amostras surgiu, exactamente, um problema relacionado com a existência de substâncias interferentes com o mesmo tempo de retenção e emitindo nos mesmos comprimentos de onda de alguns dos analitos em estudo, inviabilizando a determinação precisa destes [32].

Após algumas experiências e detecção desses interferentes foi possível reduzir grande parte. Apesar disso, continuavam a persistir alguns, os quais, mesmo após variadíssimas tentativas, não foi possível a sua eliminação, no entanto esses já não se inseriam no mesmo tempo de retenção que os analitos em estudo, pelo que se tornou possível obter uma boa resolução entre este e os restantes compostos.

4.3. Calibração analítica

Os 4 PAH's em estudo foram identificados por comparação cromatográfica com padrões externos e com base nos seus tempos de retenção. A injeção de cada uma das soluções padrão destes compostos permitiu assim conhecer os seus tempos de retenção e a sequência de eluição dos mesmos, a qual é, do primeiro para o último, benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno e por fim o padrão interno benzo[b]criseno.

A figura seguinte apresenta um cromatograma representativo de uma solução padrão (100 µg/kg) de PAH's lida por fluorescência, sendo possível verificar uma boa resolução dos 5 compostos estudados.

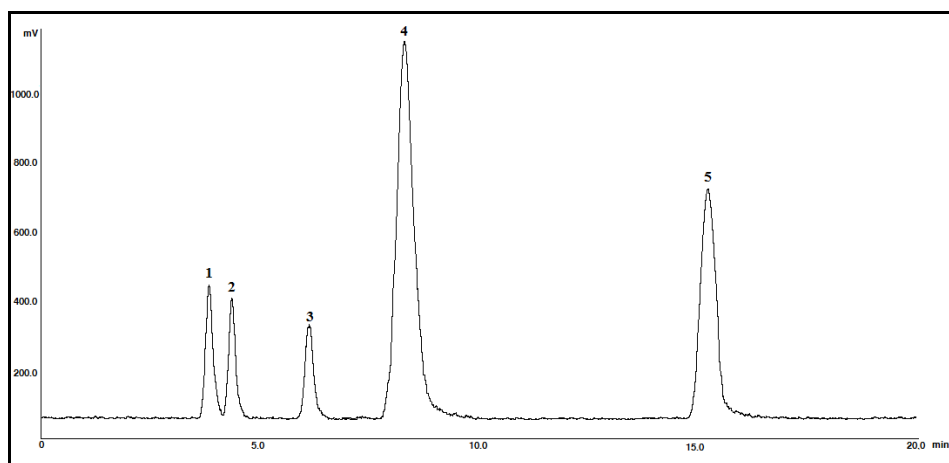


Figura 14 - Cromatograma de uma solução padrão dos 5 PAH's analisados (100 µg/kg)

1 – benz[a]antraceno 2 – criseno 3 – benzo [b]fluoranteno 4 – benzo[a]pireno 5 – benzo[b]criseno

Tabela 17 – Tempos de retenção dos PAH's em estudo

Composto	Tempo de retenção (min)
Benz[a]antraceno	3,9
Criseno	4,4
Benzo [b]fluoranteno	6,9
Benzo[a]pireno	8,4
Benzo[b]criseno	15,2

As rectas de calibração (gráfico 5 a 9) foram obtidas pela injeccção em duplicado de soluções padrão dos 5 PAH's, abrangendo uma larga gama de concentrações (50, 25, 20, 10, 5,2, 1 e 0,5 µg/kg).

Recta de calibração Benzo[a]Antraceno

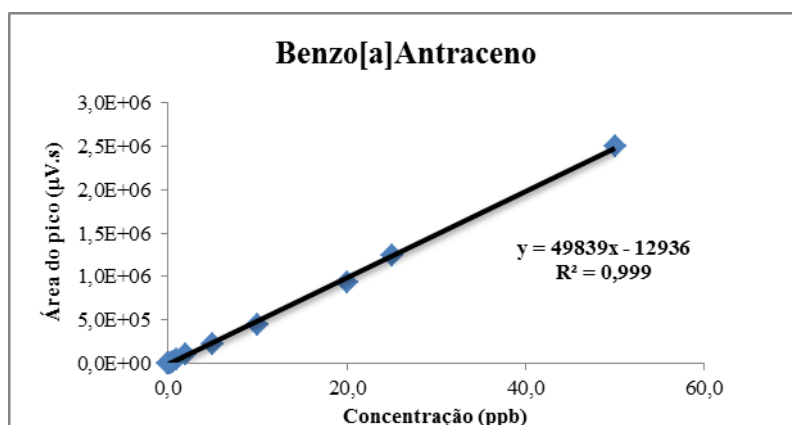


Gráfico 5 - Recta de calibração Benzo[a]Antraceno

Recta de calibração de Criseno

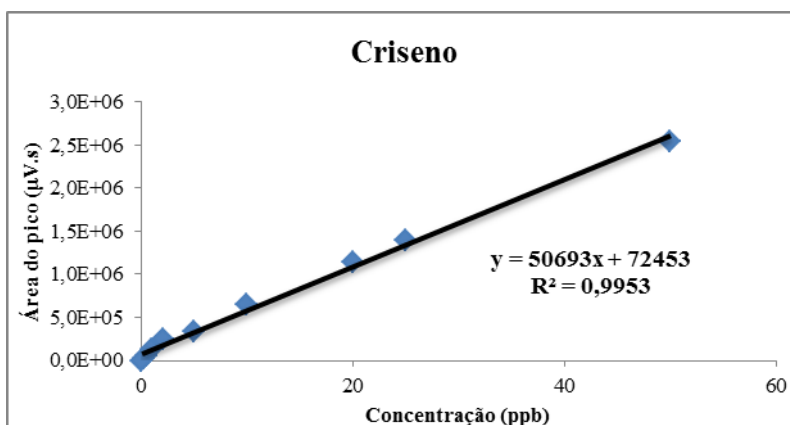


Gráfico 6 - Recta de calibração de Criseno

Recta de calibração de Benzo[b]Fluoranteno

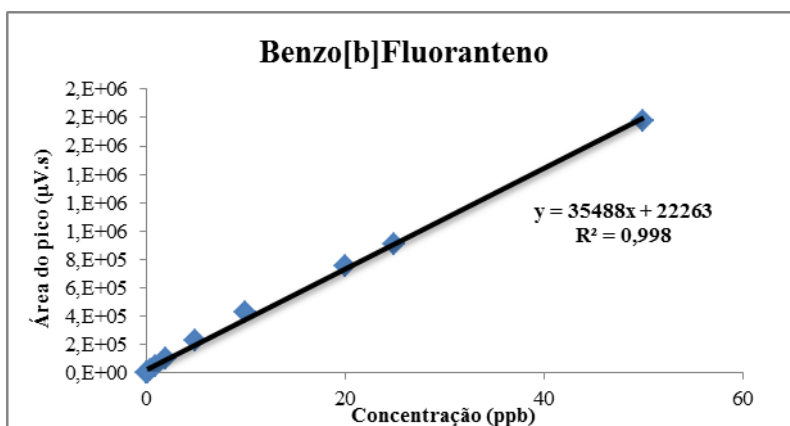


Gráfico 7 - Recta de calibração de Benzo[b]Fluoranteno

Recta de calibração de Benzo[a]Pireno

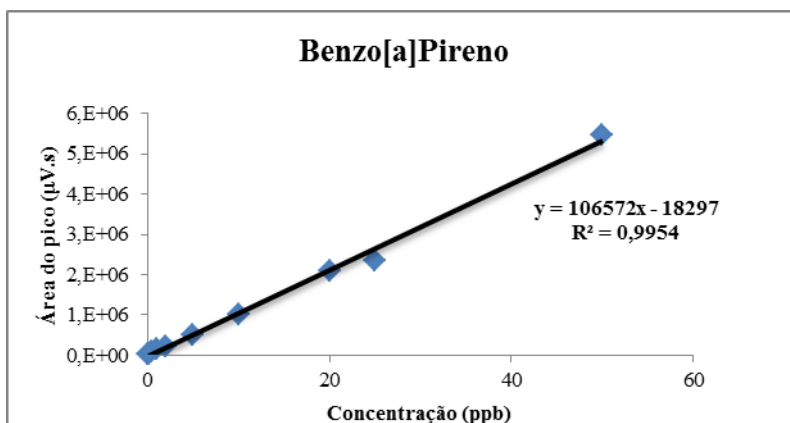


Gráfico 8 - Recta de calibração de Benzo[a]Pireno

Recta de calibração de Benzo[b]Criseno

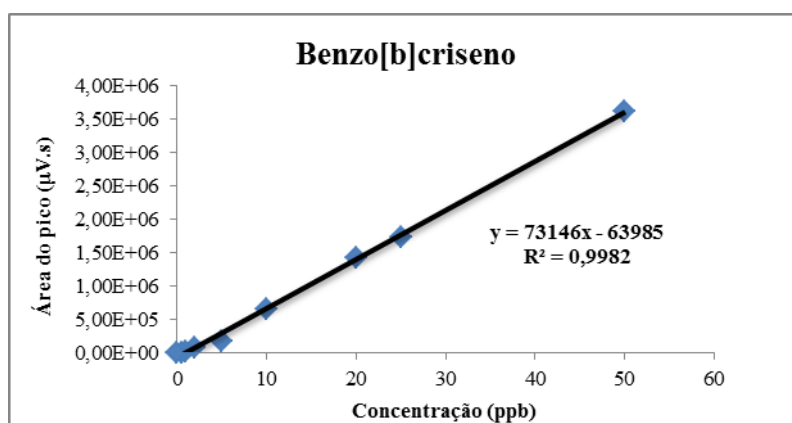


Gráfico 9 - Recta de calibração de Benzo[b]Criseno

4.4. Intervalo de Linearidade Analítica

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados numa faixa analítica especificada. Deste modo, o estudo da linearidade de resposta consistiu na injeção da solução padrão constituída pelos 5 PAH's (4 PAH's + padrão interno) em concentrações progressivamente superiores até cobrir o espectro de concentrações habitualmente detectados em amostras de óleos vegetais.

Através dos gráficos anteriores – gráfico 5 a 9 – e do coeficiente de determinação (r^2) de cada uma das rectas de calibração, pode-se observar uma correlação linear para todos os compostos analisados, até à concentração máxima testada, 50 µg/kg, suficiente para abranger toda a gama de concentrações detectadas neste estudo. Conclui-se ainda que o modelo aplicado para cada analito em estudo explica entre 99,53% e 99,9% da variância total do modelo em questão.

4.5. Cálculo dos limites de detecção e quantificação

O limite de detecção de um analito é a menor quantidade deste que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto, correspondendo à concentração mínima que é possível distinguir num branco. Como referido anteriormente, devido às características do equipamento onde foi efectuado este estudo, nomeadamente ao desgaste da coluna e idade da lâmpada, é possível distinguir, mesmo através da análise visual de amostras de concentração conhecida de analito, bastante "ruído" na linha de base dos cromatogramas. Através desta comparação visual foi possível atribuir como limite de detecção do método cerca de 0,5 µg/kg, por se tratar da concentração

mínima possível de distinguir num branco aquando da realização das calibrações, como aliás já foi referido anteriormente. Este valor aplica-se aos 5 compostos em estudo.

De uma forma mais específica, o limite de detecção foi estimado a partir da amplitude do ruído, ou da razão sinal – ruído, através de dois métodos: método da amplitude máxima de ruído e amplitude média de ruído. Para cada análise foram realizadas 3 ensaios de 2 injeções.

Amplitude máxima do ruído

Os limites de detecção máximos para cada PAH foram calculados como sendo a concentração correspondente a três vezes a altura máxima do ruído de um branco multiplicado por um factor de conversão R, isto é:

$$R = \frac{C_{Analito}}{h_{Pico}}$$

$$Ld_{(Amplitude\ Máxima)} = 3 \times h_{Máxima} \times R$$

Onde,

R – Factor de conversão

$h_{Máxima}$ – Amplitude máxima do ruído

$Ld_{(Amplitude\ Máxima)}$ – Limite de detecção

$C_{Analito}$ – Concentração de analito

h_{Pico} – Altura do pico

O factor de conversão, R, foi calculado para cada um dos analitos, a partir de um pico correspondente a cada analito com uma concentração 10 vezes superior à amplitude do ruído. Os limites de detecção dos compostos estão indicados na tabela seguinte.

Tabela 18 – Limites de detecção (µg/kg) obtidos através do método da amplitude máxima de ruído

Composto	Limites de detecção – Método Amplitude máxima do Ruído (ppb)
Benzo[a]antraceno	0,47
Criseno	0,58
Benzo[b]fluoranteno	0,63
Benzo[a]pireno	0,20
Benzo[b]criseno	0,28

Amplitude média do ruído

Os limites de detecção médios para cada PAH foram calculados como sendo a concentração correspondente a três vezes a altura média do ruído de um branco multiplicado por um factor de conversão R, isto é:

$$R = \frac{C_{Analito}}{h_{Pico}}$$

$$Ld_{(Amplitude\ Média)} = 3 \times h_{Média\ ruído} \times R$$

Onde,

R – Factor de conversão

$H_{Média\ ruído}$ – Altura média de ruído

$Ld_{(Amplitude\ Média)}$ – Limite de detecção

$C_{Analito}$ – Concentração de analito

h_{Pico} – Altura do pico

O factor de conversão, R, foi calculado a partir de um pico correspondente a um analito com uma concentração 10 vezes superior à amplitude do ruído. Os limites de detecção dos compostos estão indicados na tabela seguinte.

Tabela 19 - Limites de detecção (µg/Kg) obtidos através do método da amplitude média do ruído

Composto	Limites de detecção - Método Amplitude média do Ruído (ppb)
Benzo[a]antraceno	0,23
Criseno	0,29
Benzo[b]fluoranteno	0,31
Benzo[a]pireno	0,10
Benzo[b]criseno	0,14

Pode se observar uma diferença de quase 50% entre os valores obtidos através dos dois métodos.

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada com uma precisão e exactidão aceitáveis.

$$Lq = X_0 + 10 \times \sigma_0$$

Onde,

X_0 – Média aritmética do teor médio de n brancos preparados e injectados de uma forma independente e ao longo de vários dias

σ_0 – Desvio padrão de n brancos

Lq – Limite de quantificação

Para a determinação do limite de quantificação foram realizados 10 ensaios de brancos (n=10). Foi obtido um limite de quantificação de 1 µg/kg.

Tabela 20 - Limites de quantificação (µg/kg)

Parâmetros obtidos
$X_0 = 0,43$
$\sigma_0 = 0,07$
Lq = 1,13

De forma a testar e a garantir a precisão e exactidão do limite de quantificação prepararam-se 5 soluções fortificadas com uma concentração equivalente ao limite de quantificação e calculou-se o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_R) e ainda a percentagem de recuperação do analito (%).

Tabela 21 – Análise de repetibilidade e percentagem de recuperação do analito com concentração próxima do limite de quantificação

Composto	Área média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)	Percentagem de Recuperação (%)
Benzo[a]antraceno	44856,1	2504,0	5,58	116,0
Criseno	94820,0	12110,2	12,77	44,1
Benzo[b]fluoranteno	47251,5	1205,4	2,55	70,4
Benzo[a]pireno	99124,3	6371,6	6,43	110,2
Benzo[b]criseno	21733,8	534,4	2,46	117,2

Os coeficientes de variação (CV_R) para os 5 analitos em estudo estão compreendidos entre 2,46 e 12,77% e a percentagem de recuperação varia entre 44,1 % para o criseno e 117,2% para o Benzo[b]criseno. Este erro de cerca de 30% a 60% observado na percentagem de recuperação pode-se dever a inúmeros factores, nomeadamente, à dificuldade inerente em proceder à fortificação da matriz com a concentração de 1 ppb, pois é necessária uma diluição demasiado grande das soluções padrão.

4.6. Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados obtidos correspondentes a várias análises sobre uma mesma amostra, em condições definidas. É uma medida do grau de repetibilidade - do equipamento e do método - ou reprodutibilidade do método analítico.

4.6.1. Precisão do Equipamento

A repetibilidade do equipamento foi testada analisando a mesma solução 3 vezes e por análise visual pode-se constatar um rigor total.

4.6.2. Precisão do Método

Para o estudo da repetibilidade do método foram realizados 6 ensaios, efectuados com matrizes fortificadas com soluções padrão dos 5 PAH's (4 PAH's + padrão interno) com uma concentração de 20 µg/kg cada um. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da repetibilidade (CV_R) dos resultados obtidos para cada um dos compostos encontram-se descritos na tabela 22.

O coeficiente de variação de repetibilidade é dado por:

$$CV_R = \frac{\sigma}{\text{média}} \times 100$$

Tabela 22 – Análise de Repetibilidade do método analítico (n=6)

Composto	Área média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)	Percentagem de recuperação (%)
Benzo[a]antraceno	900646,0	36720,4	4,08	91,7
Criseno	755672,1	56610,2	7,49	67,4
Benzo[b]fluoranteno	649120,3	24805,4	3,82	88,3
Benzo[a]pireno	2404397,7	81516,5	3,39	113,7
Benzo[b]criseno	1825201,4	29720,8	1,63	129,1

A análise dos coeficientes de variação (CV_R), compreendidos entre 1,63 e 7,49 % permite concluir que o método cromatográfico aplicado apresenta uma precisão dentro do esperado para este tipo de metodologias, tratando-se esta da determinação de um contaminante em amostras complexas como é o caso dos óleos vegetais [33].

4.7. Exactidão/Veracidade

A exactidão ou veracidade do método é a concordância entre o resultado obtido e o verdadeiro valor. É definida em termos das percentagens de recuperação do analito, juntamente com os intervalos de confiança e precisão.

No processo analítico presente, a exactidão do método consiste na sua capacidade ou rendimento/eficiência da extracção sólido-líquido, executaram-se assim estudos de recuperação com recurso a dois métodos – fortificação da matriz sem analito e técnica da adição padrão.

A fortificação da matriz sem analito consistiu na capacidade de recuperação do método recorrendo a óleo branco - matriz de amostra sem o analito. Este teste, foi levado a cabo adicionando 0,2 µL da solução padrão de 10 ppm a 0,5 g de óleo branco – 4,0 ppb de cada solução padrão, transferindo depois esta mistura para um cartucho SPE e cumprindo o procedimento analítico subsequente. Este ensaio foi realizado em triplicado. A partir das quantidades determinadas de cada composto, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

A percentagem de recuperação é dada por:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{Observada}}}{C_{\text{Fortificada}}} \times 100$$

A média das recuperações e dos respectivos coeficientes de variância, encontram-se descritos na tabela 23.

Tabela 23 – Análise de recuperações no método analítico sem matriz

Composto	Concentração média obtida (µg/kg)	Percentagem de recuperação (%)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Benzo[a]antraceno	4,3	107,5	0,3	7,0
Criseno	2,6	65,0	0,8	30,8
Benzo[b]fluoranteno	3,2	80,0	0,2	6,3
Benzo[a]pireno	3,8	95,0	0,5	13,2
Benzo[b]criseno	4,4	110,0	0,7	15,9

Pela leitura da tabela, pode-se constatar que as recuperações obtidas (65,0 a 110,0%) são satisfatórias, tendo em consideração a "complexidade" do processo extractivo. De facto, extrair o mais selectivamente possível quantidades tão reduzidas de compostos lipossolúveis de um óleo alimentar, que se dissolve nos mesmos solventes, é uma tarefa analítica bastante complicada.

Uma forma de obter melhores resultados seria efectuar mais etapas de extracção e purificação, de forma a isolar os analitos da matriz, remover as interferências e melhorar a sensibilidade do método. Todavia, estes procedimentos seriam bastante complexos e morosos, além de que, quanto mais etapas maior é o risco de acarretar erros adicionais.

A técnica de adição padrão consistiu na utilização de uma matriz de óleo de soja refinado, contaminado com concentração de PAH's conhecidas e inferiores a 1 ppb. O óleo de soja refinado foi sujeito ao processo de análise completo descrito anteriormente, nomeadamente com a adição de uma

concentração conhecida (4ppb) de cada PAH. Cada um destes ensaios foi realizado em triplicado. A partir das quantidades determinadas de cada composto e do seu teor original, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

A percentagem de recuperação é dada por:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{Observada}} - C_{\text{Amostra}}}{C_{\text{Fortificada}}} \times 100$$

Tabela 24 – Análise de recuperações no método analítico com matriz

Composto	Concentração média sem adição de padrão (µg/kg)	Concentração média com adição de padrão (µg/kg)	Percentagem de recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
Benzo[a]antraceno	<1,0	4,1	83,7	14,6
Criseno	<1,0	2,9	59,2	34,5
Benzo[b]fluoranteno	<1,0	3,5	71,4	11,4
Benzo[a]pireno	<1,0	3,9	79,6	17,9
Benzo[b]criseno	<1,0	4,3	87,8	16,3

Comparando as duas tabelas anteriores e numa primeira análise, pode-se constatar que há uma diferença significativa entre os resultados obtidos no que respeita ao rendimento de extracção na ausência (65,0 a 110,0%) ou na presença de matriz alimentar (59,2 a 87,8%).

De entre outras, as diferenças encontradas podem ser explicadas pela natureza lipofílica da matriz alimentar, que dificulta a extracção dos PAH's. É também interessante observar que a percentagem de recuperação na fortificação de matrizes sem analito, regra geral, aumenta com o aumento da concentração com que se fortifica. Uma explicação possível para este facto pode ser devido à dificuldade inerente de preparar soluções padrão em concentrações tão baixas.

Pode – se encontrar na bibliografia vários autores que defendem que rendimentos de extracção médios superiores a 50% são aceitáveis para análises de avaliação de risco de contaminantes alimentares [34].

4.8. Gama de trabalho

Considera-se a gama de trabalho o intervalo de concentrações em que o método providencia um nível aceitável de linearidade, precisão e exactidão. Tendo em consideração os últimos capítulos podemos considerar a gama de trabalho para o método analítico descrito entre 1 µg/kg a 50 µg/kg.

4.9. Estabilidade das soluções

De modo a estudar a estabilidade das soluções durante o tempo necessário à análise, comparam-se os resultados de análises de soluções que já tinham sido preparadas, num período mínimo de 24h, com soluções preparadas diariamente. Os resultados mostram que ao fim de 72h as soluções ainda se mantêm estáveis, sendo este tempo mais que suficiente para efectuar a análise, tendo em conta que uma análise completa demora 2h30.

5. Conclusão

5.1. Vantagens e desvantagens do método e trabalhos futuros

A metodologia seleccionada para a execução analítica deste trabalho de investigação teve como alicerces a ISO 15753:2006. No entanto, como já foi referido anteriormente, este método tornar-se-ia extremamente moroso e de elevados custos - fundamentalmente pela quantidade de cartuchos de SPE utilizados. Para além disso, utilizam-se vários solventes diferentes e quantidades de volumes relativamente acrescidas em cada ensaio extractivo, a que se juntam ainda os gastos de eluentes na separação cromatográfica, pelo que se trata de um método pouco "amigo do ambiente".

Os resultados obtidos no método descrito permitem concluir que esta técnica deve ser alvo de algumas melhorias, principalmente ao nível das recuperações alcançadas na presença de uma matriz alimentar, que pode dever-se essencialmente a um baixo rendimento da extracção sólido líquida. Pode indicar-se como sendo o composto com piores resultados o criseno, o que pode ser justificado pelo facto da solução padrão deste ter sido preparada de forma diferente e da sua preparação acarretar mais dificuldades e originar mais erros. Sugere-se como possível trabalho futuro a substituição do padrão criseno por uma solução líquida idêntica às outras utilizadas de forma a evitar erros ao traçar a curva de calibração.

A etapa de evaporação do solvente também pode gerar perdas consideráveis dos PAH's mais voláteis, tendo em conta que é necessário a secagem completa do recipiente onde estes se encontram.

A utilização de um padrão interno neste procedimento, apesar de não ser uma solução universal de todos os problemas, contribui inevitavelmente para evitar possíveis erros relacionados com a ineficiência da etapa de extracção sólido-líquido. A utilização de padrões internos já é hábito nos estudos de avaliação de PAH's para a monitorização de eventuais perdas de analitos durante a purificação e, caso necessário, sua correcção.

Com a implementação deste método torna-se interessante, num futuro próximo, realizar vários estudos como por exemplo: a tendência da concentração de PAH's em óleos crus consoante o seu país de origem, a percentagem de redução de PAH's no óleo em função do caudal de adição de carvão activado utilizado no processo de refinação, entre outros.

5.2. Comparação do teor de PAH's em óleos vegetais com laboratórios externos

Com o intuito de obter uma melhoria constante dos resultados, e de forma a validar o método implementado para a determinação dos PAH's, durante a execução deste trabalho foram realizadas várias comparações dos resultados obtidos com resultados de laboratórios externos acreditados.

Apesar de se considerar um principal laboratório externo de referência, chegou-se a enviar a mesma amostra para 3 laboratórios diferentes de modo a confirmar os resultados. Através da análise dos valores obtidos nos diferentes laboratórios conclui-se que em algumas amostras existem desvios de até 35% no teor de PAH's.

Na tabela 25 do anexo 1 encontram-se como exemplo discriminados, o teor de PAH's em 8 amostras de três óleos vegetais diferentes analisados interna e externamente e o respectivo desvio obtido em cada composto.

Com base nestes e muitos outros resultados obtidos ao longo de 6 meses foi possível desenvolver um estudo dos desvios obtidos, por defeito e por excesso, para cada composto em particular:

Benzo[a]pireno

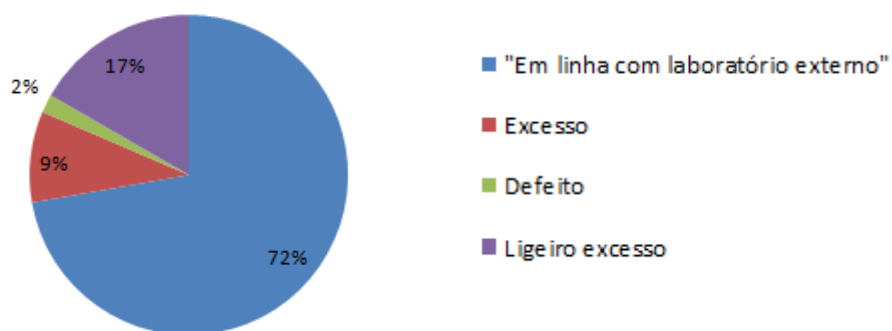


Gráfico 10 – Desvios obtidos no composto Benzo[a]Pireno na comparação com resultados externos

- 72 % dos resultados de BaP obtidos internamente estão em linha com o laboratório externo;
- Apenas em 2% das amostras se verificou obtenção de resultados por defeito;
- Em 9% das amostras analisadas foram obtidos resultados por excesso;
- Em 17% das amostras, obtiveram-se resultados ligeiramente acima (até 0,5 ppb acima).

Benzo[a]antraceno

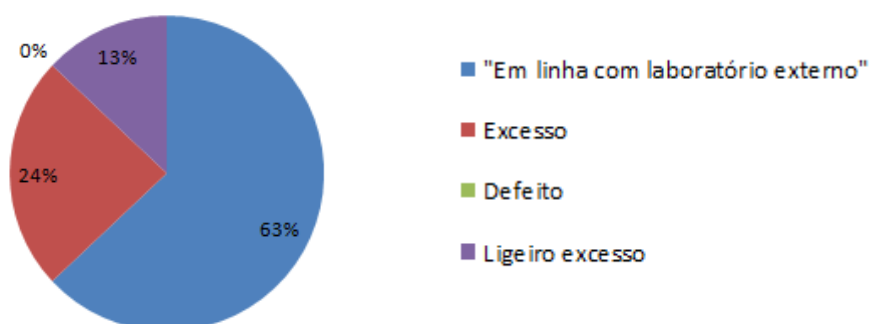


Gráfico 11 - Desvios obtidos no composto Benzo[a]Antraceno na comparação com resultados externos

- 63 % dos resultados de BaA obtidos internamente estão em linha com o laboratório externo;
- Não se verifica a obtenção de resultados por defeito;
- Em 24% das amostras analisadas foram obtidos resultados por excesso;
- Em 13% das amostras, obtiveram-se resultados ligeiramente acima (até 0,5 ppb acima).



Gráfico 12 - Desvios obtidos no composto Criseno na comparação com resultados externos

- 52 % dos resultados de Cri obtidos internamente estão em linha com o laboratório externo;
- Verifica-se que estamos a obter 22 % de resultados por defeito;
- Em 13 % das amostras analisadas foram obtidos resultados por excesso;
- Em 13% das amostras, obtiveram-se resultados ligeiramente acima (até 0,5 ppb acima).

Estes resultados que dizem respeito ao composto criseno confirmam mais uma vez o que já se tinha vindo a concluir, ou seja que se trata do composto com percentagem de recuperação (22,0%) relativamente aos outros 3.

Benzo[b]fluoranteno

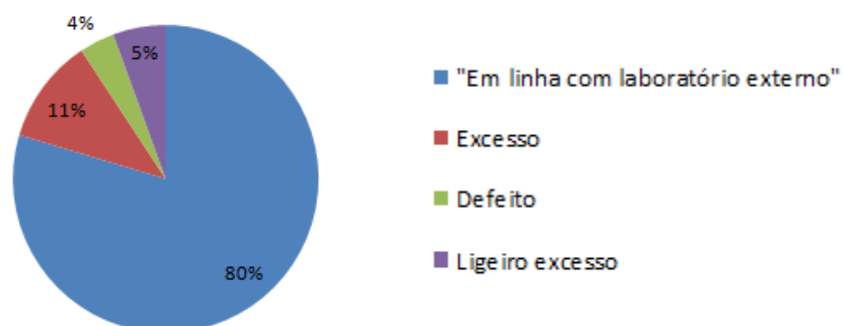


Gráfico 13 - Desvios obtidos no composto Benzo[b]fluranteno na comparação com resultados externos

- 80 % dos resultados de BbF obtidos internamente estão em linha com o laboratório externo;
- Verifica-se que estamos a obter 4 % de resultados por defeito;
- Em 11 % das amostras analisadas foram obtidos resultados por excesso;
- Em 5 % das amostras, obtiveram-se resultados ligeiramente acima (até 0,5 ppbacima).

6. Evolução dos teores de PAH's ao longo do processo de refinação dos óleos vegetais

Tendo em conta que a teoria da síntese endógena tem, actualmente, poucos defensores, pode-se pressupor que as sementes oleaginosas estão naturalmente isentas de PAH's. Desta forma, a possível contaminação das sementes por estes compostos, e consequentemente dos óleos vegetais em que resultarão, é de origem exógena.

No entanto, e apesar da diversa e inevitável exposição, os teores de PAH's encontrados actualmente nos óleos vegetais são relativamente baixos, o que leva a querer que o processo de refinação a que os óleos vegetais estão sujeitos traduz-se na redução dos teores de PAH's, como aliás, foi observado por alguns autores [23].

De acordo com o procedimento tecnológico da SOP, o processo de refinação consiste em quatro etapas fundamentais: Desgomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. A grande redução do teor de PAH's ocorre na etapa de branqueamento, com o uso de carvão activado. No entanto, através da experiência adquirida e um conhecimento profundo de todo o processo é possível actuar em diversas zonas do processo de forma a diminuir a concentração de, por exemplo, um PAH em particular.

O uso de carvão activado no processo de refinação do óleo está intimamente ligado ao processo de branqueamento deste. A dosagem do carvão ocorre ao mesmo tempo que as terras de branqueamento, pois é adicionado ao branqueador. Para operações de relativamente pequena escala, as misturas de carvão nas terras de branqueamento até são oferecidas, em teores estabelecidos, pelos próprios fabricantes, encontrando-se assim estas prontas a usar, sem ser necessário nenhum doseamento no próprio local.

De forma a tirar conclusões acerca do poder de redução do teor de PAH's no processo de refinação foram analisados óleos vegetais crus, de soja (produto geralmente refinado na refinaria da SOP), e óleos vegetais refinados, correspondentes a esses mesmos óleos crus após serem submetidos ao processo de refinação.

Para esta análise utilizaram-se óleos vegetais crus, com uma concentração de PAH's inicial conhecida e sabendo à priori, através de resultados de laboratórios externos, que era bastante elevada. Só desta forma é que foi possível fazer este estudo pois caso fossem utilizados óleos vegetais crus com concentrações de PAH's inferiores ao limite de quantificação - 1,0 ppb - não se obtinham resultados satisfatórios.

Tabela 25 – Resultados dos teores de PAH's antes e depois do processo de refinação

Amostras / Composto		Óleo vegetal cru (antes do processo de refinação) [ppb]	Óleo vegetal refinado (depois do processo de refinação) [ppb]	% Redução
Amostra 1	Benzo[a]antraceno	3,8	<1,0	>73,7
	Criseno	4,5	<1,0	>77,8
	Benzo[b]fluoranteno	2,0	<1,0	>50,0
	Benzo[a]pireno	1,8	<1,0	>44,4
	Soma 4 PAH's	12,1	<1,0	>91,7
Amostra 2	Benzo[a]antraceno	2,3	<1,0	>56,5
	Criseno	3,5	<1,0	>71,4
	Benzo[b]fluoranteno	1,5	<1,0	>33,3
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-
	Soma 4 PAH's	7,3	<1,0	>86,3
Amostra 3	Benzo[a]antraceno	1,3	<1,0	>23,1
	Criseno	1,5	<1,0	>33,3
	Benzo[b]fluoranteno	2,0	<1,0	>50,0
	Benzo[a]pireno	1,4	<1,0	>28,6
	Soma 4 PAH's	6,2	<1,0	>83,9

Em cada uma das amostras de óleos vegetais estudados observou-se uma redução conjunta dos teores totais de PAH's durante a refinação, tal como já havia sido demonstrado em trabalhos anteriormente realizados.

A concentração global de PAH's decresceu em média 87% após refinação destes. A magnitude destas reduções foi similar às observadas por Larsson (82-84%) [35]. Conclui-se também que quanto maior for a concentração inicial de PAH's, obviamente, maior é a percentagem de redução. Possivelmente, isto deve-se também ao facto de a aplicação de carvão activado no branqueamento ser superior nestas amostras. Pode-se também verificar que o composto com maior percentagem de redução é o criseno (em média 60%) e com menor percentagem é o Benzo[a]pireno, cerca de 24%, o que mais uma vez se pode dever ao facto de serem os compostos com maior e menor concentração respectivamente.

7. Bibliografia

- [1] www.Sovenagroup.com , acedido a 3 de Março de 2014
- [2] Manual da Qualidade da Sovena Oilseeds Portugal S.A.
- [3] <http://eur-lex.europa.eu/pt/index.htm> , acedido a 3 de Março de 2014
- [4] <http://www.iupac.org/>, acedido a 3 de Março de 2014
- [5] Finot P.A., H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell, R. Liardon (1990). *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*.
- [6] Peter E.T.Douben (1998). *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, Wiley.
- [7] Harbinson R, Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology (1998). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, 5ªEdição.
- [8] Harvey RG. (1998). *The Handbook of Environmental Chemistry of PAHs and Related Compounds*, Nielsen AH. London: Springer Verlag.
- [9] International Agency for Research on Cancer (1983). *Polycyclic aromatic compounds*, In: Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- [10] Portal da EPA em <http://www.epa.gov/safewater>, acedido a 3 de Março de 2014
- [11] Musial C.J., Uthe J.F. (1991) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (edition). Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. London: Academic Press. (3639-3644)
- [12] Tamakawa K., Kato, Oba M. (1996). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Leo Nollet (ed). Handbook of Food Analysis. New York: Marcel Dekker (1641-1664)
- [13] Hawthorne S.B. Yang Y., Miller D.J. (1994), *Analytical Chemistry* (2912-2920)
- [14] Kang J.J., Fang H.W.(1997) *Biochemical and Biophysical Research Communications* (367-369)
- [15] International Programme on Chemical Safety, 1998
- [16] Roel Brand, Tinus Pulles, René van Gijlswijk (2004). *European Pollutant Emission Register*

- [17] Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons - U.S. Department of health and human services- Public Health Service - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, (1995).
- [18] Ward M., Sinn R., Heineman E., Rothman N., Markin R., Weisenburger D., Corrêa P., Zahn S. (1997). *International Journal of Cancer* (71:14-19)
- [19] Gary R. List (2009). *Bleaching and Purifying Fats and Oils, Theory and Practice*, 2a edition
- [20] Carl E. Cerniglia, John B. Sutherland (2006). *Relative roles of bacteria and fungi in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and bioremediation of contaminated soils*.
- [21] National Academy of Science (1986). *Drinking water and health*. Washington DC: National Academy Press.
- [22] Suess MJ. (1976). *The science of the Total Environment*.(6:239-250)
- [23] Dennis M.J., Massey R.C., Cripps G., Venn I., Howarth N., Lee G. (1991). *Food Additives and Contaminants* (285:127-133)
- [24] Guillen MD, Sopelana P, Partearroyo MA. (2000). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (11:669-684)
- [25] Menzie CA, Potocki BB (1992). *Santodonato Journal of Environmental Science Technology* (26: 1278-1284)
- [26] Lopez Garcia A, Blanco Gonzalez E, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A. (1992). *Analytica Chimica Acta*. (264: 241-248)
- [27] ISO 15753:2006 “Animal and vegetables fats and oils – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- [28] Henriques M.L.G.S. (2008). *Hormonas Naturais e de Síntese, Bisfenol A, Octifenol e Nonilfenol em Águas para Consumo Humano: Optimização do Método de Análise por SPE-LC-ESI-MS/MS*, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia.
- [29] Portal da Sigma Aldrich em <http://www.sigmaaldrich.com/> , acedido a 3 de Março de 2014
- [30] António Ferreira (2013) *Introdução à validação de Métodos analíticos*.
- [31] Dorthe AM., Ramberti JL.(2000) *Thienpont A. Analisis*; (28: 587-591)
- [32] Instituto Português de Acreditação (2005), *Guia para acreditação de laboratórios químicos*.
- [33] Huber, L. (1998) *LC-GC Int*.

- [34] Menichini E, Domenico A, Bonanni L. (1991) *Journal of Chromatography* (555: 211-220)
- [35] Larsson BK, Eriksson AT, Cervenka M. (1987) *Journal of the American Oil Chemists' Society* (64: 365-370)

8. Anexos

Anexo 1

Tabela 26 – Resultados comparativos do teor de PAH's em óleos vegetais com laboratório externo

Óleo de Soja Refinado *					
		Laboratório Interno (ppb)	Laboratório Externo (ppb)	% Desvio	Δ (Int. – Ext.)
Amostra 1	Benzo[a]antraceno	<1,0	<1,0	-	0
	Criseno	<1,0	<1,0	-	0
	Benzo[b]fluoranteno	<1,0	<1,0	-	0
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-	0
	Soma 4 PAH's	<1,0	<1,0	-	0

*Em todas as amostras de óleo de soja refinado foram obtidas concentrações inferiores ao limite de quantificação, tanto no laboratório interno como em laboratórios externos

Óleo de Soja Cru					
		Laboratório Interno (ppb)	Laboratório Externo (ppb)	% Desvio	Δ (Int. – Ext.)
Amostra 2	Benzo[a]antraceno	3,8	4,2	9,5	0,4
	Criseno	4,5	2,9	35,6	1,6
	Benzo[b]fluoranteno	2,0	2,2	9,1	0,2
	Benzo[a]pireno	1,8	1,8	0	0
	Soma 4 PAH's	12,1	11,1	8,3	1,0
Amostra 3	Benzo[a]antraceno	2,3	2,0	13,0	0,3
	Criseno	3,5	2,8	20,0	0,7
	Benzo[b]fluoranteno	1,5	1,7	11,8	0,2
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-	0
	Soma 4 PAH's	7,3	6,5	11,0	0,8
Amostra 4	Benzo[a]antraceno	<1,0	1,4	-	-
	Criseno	1,2	1,7	29,4	0,5
	Benzo[b]fluoranteno	<1,0	<1,0	-	0
	Benzo[a]pireno	1,4	1,7	17,6	0,3
	Soma 4 PAH's	2,6	4,8	45,8	2,2
Amostra 5	Benzo[a]antraceno	<1,0	<1,0	-	0
	Criseno	1,1	<1,0	-	-
	Benzo[b]fluoranteno	<1,0	<1,0	-	0
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-	0
	Soma 4 PAH's	1,1	<1,0	-	-

Óleo de Girassol Cru					
		Laboratório Interno (ppb)	Laboratório Externo (ppb)	% Desvio	Δ (Int. – Ext.)
Amostra 6	Benzo[a]antraceno	1,8	1,4	22,2	0,4
	Criseno	2,5	1,9	24,0	0,6
	Benzo[b]fluoranteno	1,1	<1,0	-	-
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-	0
	Soma 4 PAH's	5,4	3,3	38,9	2,1
Amostra 7	Benzo[a]antraceno	1,1	<1,0	-	-
	Criseno	1,6	<1,0	-	-
	Benzo[b]fluoranteno	<1,0	<1,0	-	0
	Benzo[a]pireno	<1,0	<1,0	-	0
	Soma 4 PAH's	2,7	<1,0	-	-
Amostra 8	Benzo[a]antraceno	1,4	1,1	21,4	0,3
	Criseno	1,8	1,3	27,8	0,5
	Benzo[b]fluoranteno	<1,0	<1,0	-	-
	Benzo[a]pireno	1,4	1,0	28,6	0,4
	Soma 4 PAH's	4,6	3,4	26,1	1,2

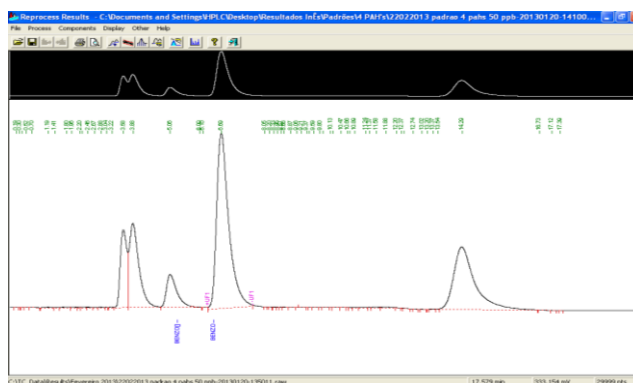
Anexo 2

Cromatogramas obtidos no estudo das condições operacionais*³

- Padrão 50 ppb
- Temperatura 20° C
- Comprimentos de onda:
 - $\lambda_{exc.} = 270nm$
 - $\lambda_{em.} = 446nm$
- Fase Móvel:
 - Solvente A: Água
 - Solvente B: Acetonitrilo

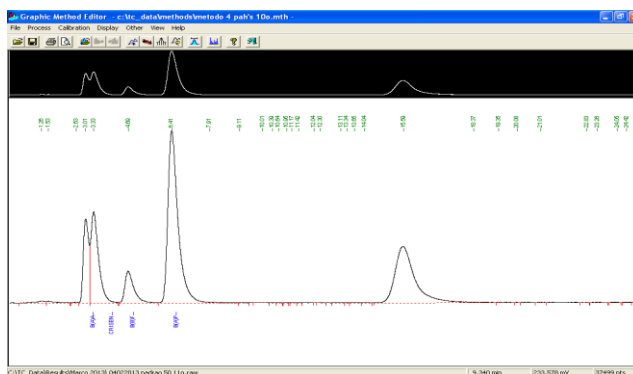
1)

- Fluxo: 1mL/ min
- Fase móvel: A: 12% B: 88%



2)

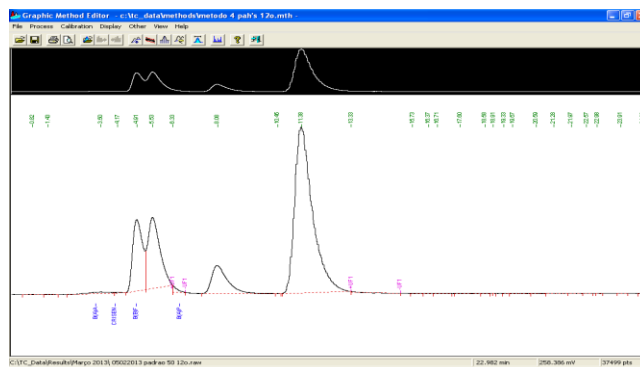
- Fluxo: 1,5mL/ min
- Fase móvel: A: 20% B: 80%



³ Apenas estão representados os que revelaram melhores resultados ou resultados aceitáveis

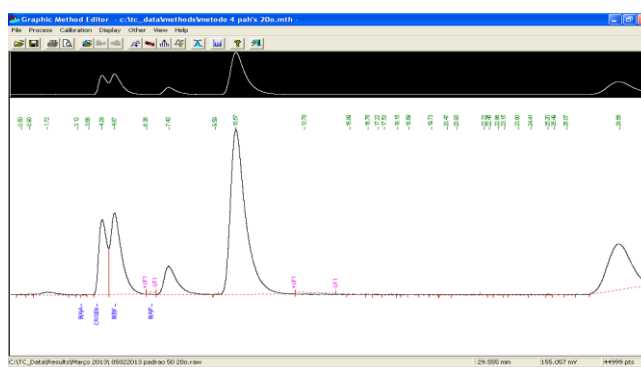
3)

- Fluxo: 0,8mL/ min
- Fase móvel: A: 20% B: 80%



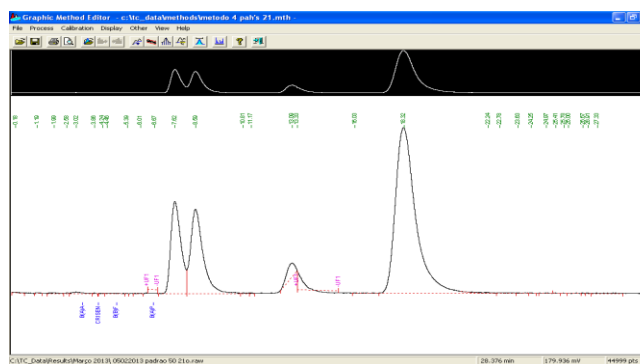
4)

- Fluxo: 1,2mL/ min
- Fase móvel: A: 25% B: 75%



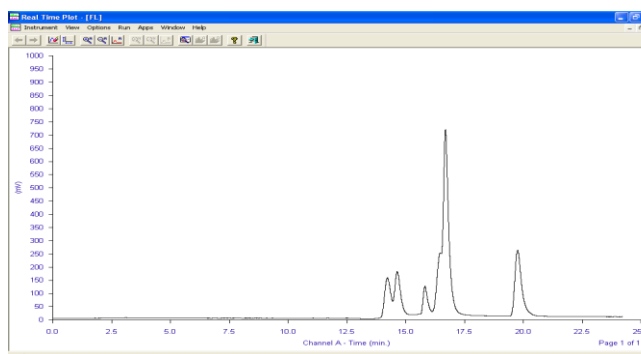
5)

- Fluxo: 1,0mL/ min
- Fase móvel: A: 30% B: 70%



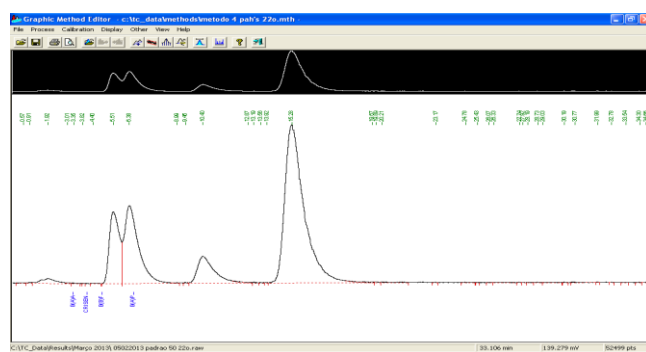
6)

- 10,0 Minutos: Fluxo: 1,0 mL/ min, Fase móvel: A: 40% B: 60%
- 15,0 Minutos: Fluxo: 1,0 mL/ min, Fase móvel: A: 0% B: 100%



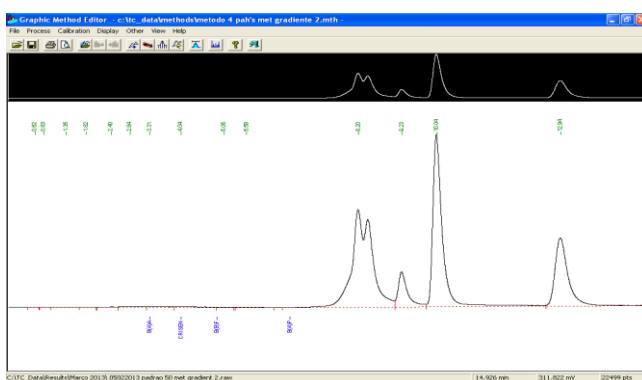
7)

- Fluxo: 1,2mL/ min
- Fase móvel: A: 30% B: 70%



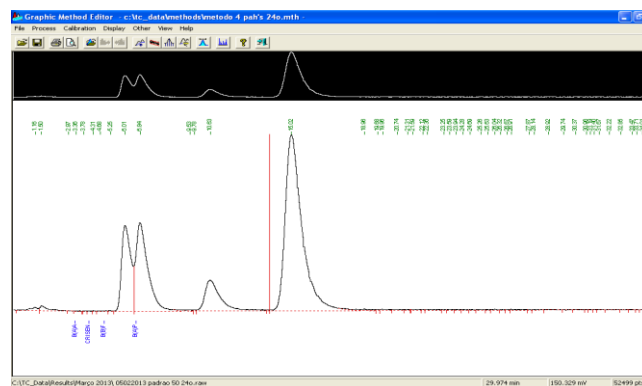
8)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 1,0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 40% B: 60%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 1,0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



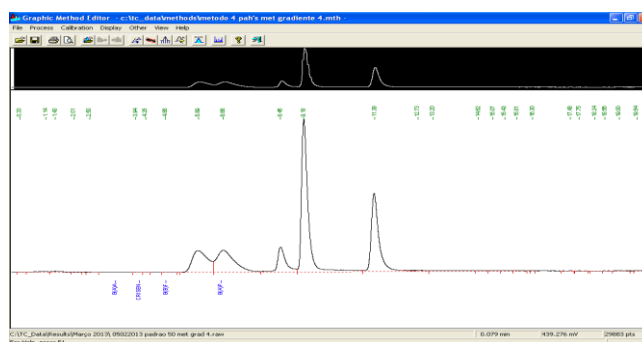
9)

- Fluxo: 1,5mL/ min
- Fase móvel: A: 30% B: 70%



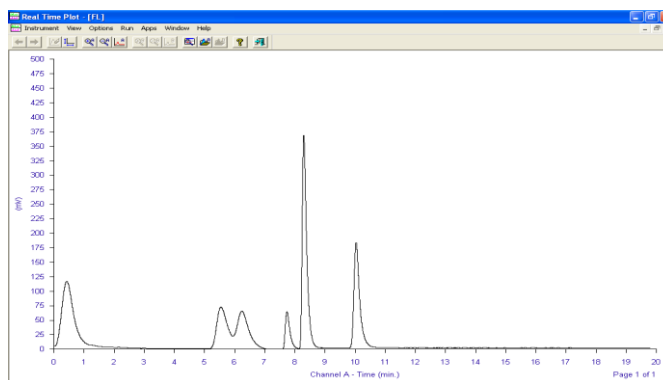
10)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 1,5 mL/ min,
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 1,5 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



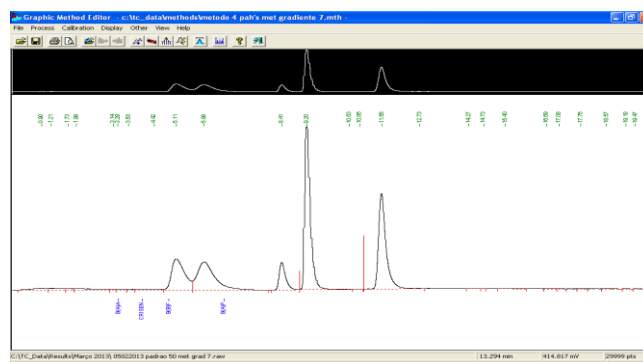
11)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 2,0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 2,0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



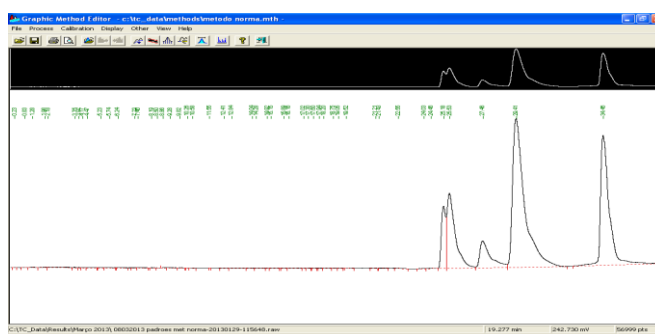
12)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 3,0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 1.5 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



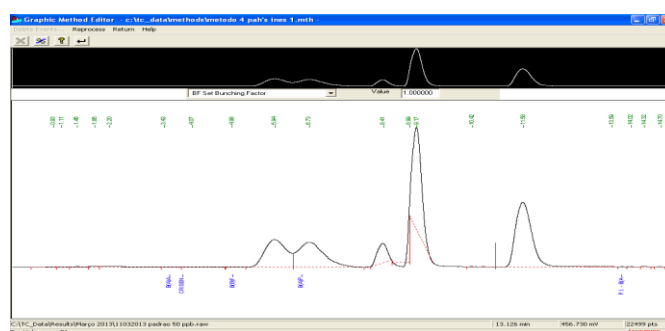
13)

- Gradiente norma ISO 15753:2006



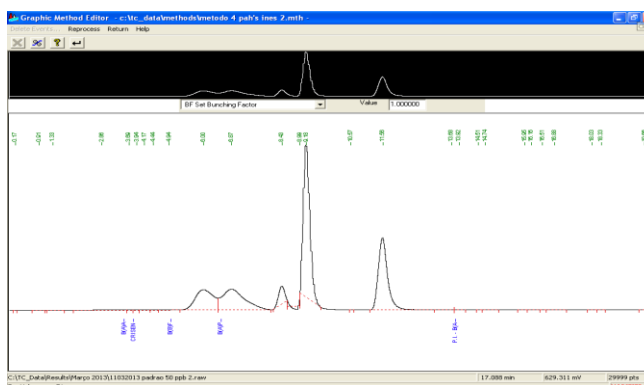
14)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 1.8 mL/ min
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 10,0 Minutos:
 - Fluxo: 1.5 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



15)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 0,8 mL/ min
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 1.5 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%



16)

- 5,0 Minutos:
 - Fluxo: 2.0 mL/ min
 - Fase móvel: A: 30% B: 70%
- 15,0 Minutos:
 - Fluxo: 1.5 mL/ min
 - Fase móvel: A: 0% B: 100%

